

Methodenentwicklung und Synthese von fluoreszierenden Liganden für die Diagnostik von Morbus Alzheimer



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte
kumulative Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Daniel Kieser
aus Darmstadt

Referent: Prof. Dr. Boris Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Mall

Tag der Einreichung: 21. März 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Mai 2011


Darmstadt 2011



„Wenn du ein Schiff bauen willst, dann rufe nicht die Menschen zusammen, um Holz zu sammeln, Aufgaben zu verteilen und die Arbeit einzuteilen, sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem großen, weiten Meer.“

Antoine de Saint-Exupéry





Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt seit Februar 2006 angefertigt.

Danksagung

Danken möchte ich:

- Herrn Prof. Dr. B. Schmidt für die interessanten Themenstellungen, die interessanten „Updates“, mit Diskussion und nützlichen Anregungen ganz unterschiedlicher Art.
 - den aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises und lieben Laborkollegen: Andrea, Alexander, Azadeh, Conny, Jiamin, Thomas, Fabio, Eva, Binia, Upendra und der Sekretärin Frau Keenan.
 - den ehemaligen Mitgliedern: Ali, Hannes, Gregor, Nicole, Stefanie, Sumaira und Rajeshwar.
 - allen Studenten, die ich auf ihrem Weg begleiten durfte, besonderes: Alva, Barbara, Blerta, Christoph, Julia, Rüdiger und Verena.
 - Alexander Boländer und Andrea Zall für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit; einen immer offen fachlichen und menschlichen Austausch und für die tolle gemeinsame Zeit (Afterjogging Bier und „Salat mit Pute“).
 - Dr. Roland Heyny-von Haussen vom Klinikum Darmstadt für die gute Zusammenarbeit und die vielen geduldigen Stunden am Fluoreszenzmikroskop.
 - Prof. Dr. Jochen Herms von der Ludwig-Maximilians-Universität München am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung sowie seinen Mitarbeitern Steffen Burghold und Christian Schön für die erfolgreiche Zusammenarbeit.
 - Prof. Dr. Mathias Jucker von der Universität Tübingen am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Abteilung: Zellbiologie Neurologischer Erkrankungen sowie seinen Mitarbeitern für die erfolgreiche Zusammenarbeit.
 - Dr. Gjermund Henriksen vom Klinikum rechts der Isar der TU München, Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik für die erfolgreiche Zusammenarbeit.
 - allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Unterstützung, besonders Frau Rudolph und Herrn Jung.
 - meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, insbesondere Helmut und Harald.
 - meinen Eltern für alles, was sie oft auch im Stillen getan haben.
 - Tine für Rat, Hilfe und Geduld.
-

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

- B. Schmidt, D. Meid, D. Kieser, „*Safe and Fast Tetrazole Formation in Ionic Liquids*“, *Tetrahedron* **2007**, 63, 492-496.
 - Nicole Höttecke, Andrea Zall, Daniel Kieser, Eva Fuchs, Katrin Schneider, Dirk Steinbacher, Robert Schubanel, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt, „*NSAID-derived γ -secretase modulators: Part IV: The isosteric replacement of a carboxylic acid on a carbazole scaffold.*“ *J. Med.Chem.*, wurde im März **2011** eingereicht.
 - Steffen Burgold, Tobias Bittner, Daniel Kieser, Martin Fuhrmann, Mario M. Dorostkar, Gerda Mitteregger, Hans Kretzschmar, Boris Schmidt & Jochen Herms, „*Kinetics of amyloid plaque formation and growth in Tg2576 mice*“, *Acta Neuropatholo.* **2011**, 121 (3), 327-335.
 - Prof. Dr. Boris Schmidt, Dipl.-Ing. Daniel Kieser, Dr. Roland Heyny-von Haußen, Prof. Dr. Jochen Herms, Dipl.-Ing. Alexander Boländer; „*Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen an der Retina*“, *Deutsche Patentanmeldung*, **2010**, Nr.: DE 10 2010 045 796.5.
 - Prof. Dr. Boris Schmidt, Dipl.-Ing. Daniel Kieser, Dr. Roland Heyny-von Haußen, Prof. Dr. Jochen Herms, Dipl.-Ing. Alexander Boländer, „*Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel*“, *Deutsche Patentanmeldung*, **2010**, Nr.: DE 10 2010 045 796.5.
 - David K. Milford, Jasmin K. Hefendehl, Daniel Eicke, Stefan Grathwohl, Bettina M. Wegenast-Braun, Daniel Kieser, Mathias Jucker, Michael E. Calhoun, „*Repeatable target location for long-term in vivo imaging of mice with multiphoton microscopys*“, *Nat. Methods*, wird voraussichtlich im März/April **2011** eingereicht.
 - Daniel Kieser, Prof. Boris Schmidt, Dr. Roland Heyny-von Haussen, „*Die verlässliche Diagnose von Alzheimer-Demenz als Schlüsselschritt zur Bekämpfung der Krankheit*“, *labor&more* 01/**2010**.
-

Poster Beiträge:

- Stefanie Baumann, Nicole Höttecke, Daniel Kieser, Boris Schmidt, *“Tic Tac Tau – Asystematic approach to protein aggregation with small molecules.”* Gesellschaft Deutscher Chemiker Wissenschaftsforum, 16. – 19. September **2007**, Ulm.
 - Prof. Boris Schmidt, Alexander Boländer, Stefanie Baumann, Daniel Kieser, Ali Taghavi, Dr. Roland Heyny-von Haussen, *„Phenylthiohydrazides – A lead for AD Tau-Aggregation Inhibitors and Tau-Imaging“*, ICAD meeting, 11.-16. Juli **2009**, Chicago.
 - Boris Schmidt, Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Hoettecke, Karlheinz Baumann, *„Replacement of a carboxylic acid by isosteres on a carbazolic scaffold provides γ -secretase modulators”* Gesellschaft Deutscher Chemiker Wissenschaftsforum, 31. August – 02. September **2009**, Frankfurt am Main.
 - Boris Schmidt, Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Hoettecke, Karlheinz Baumann, *„Carboxylic acid isosteres linked on a carbazolic scaffold as γ -secretase modulators”* ChemBioNet, 30. November – 01. Dezember **2009**, Frankfurt am Main.
 - Daniel Kieser, Alexander Boländer, Christian Schön, Dr. Tobias Bittner, Dr. Roland Heyny-von Haußen, Prof. J. Herms & Prof. Boris Schmidt, *„Alzheimer in vivo diagnostic with high fluorescent dyes“* 23. – 24. September Biophotonik **2010** Ulm.
-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1 Die Alzheimer-Demenz	4
1.1.1 Störungen im β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP) Metabolismus	7
1.1.2 Entstehung und Funktion von neurofibrillären Bündeln (NFTs) des Tau-Proteins	9
1.1.3 Die γ -Sekretase als Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer	11
1.2 Diagnose und Imaging	16
1.2.1 Die bildgebenden Verfahren für die Alzheimer-Demenz im Überblick	18
1.2.2 Forschung an Markern und Verfahren für die Alzheimer-Demenz	22
1.2.2.1 Die Forschung an weiteren möglichen Verfahren	22
1.2.2.2 Die Forschung an möglichen Alzheimer-Demenz-Markern	25
1.2.2.3 Anforderungen an medizinalchemische Fluorophore	27
1.3 Der Zebrafisch als Tiermodell	30
1.4 Synthese Methoden: Tetrazolsynthesen	31
2. Zielsetzung der Arbeit	33
3. Allgemeiner und kumulativer Teil	34
3.1 Entwicklung spezieller Synthesemethoden: Tetrazolsynthesen	34
3.2 Untersuchung der Bindungstasche von NSAID-abgeleiteten γ-Sekretase-Modulatoren durch Derivatisierung der Seitenkette und Austausch der Carbonsäurefunktion durch Säureisostere.	40
3.3 Kinetik der Amyloid-Plaques-Bildung und deren Wachstums in Tg2576 Mäusen	55
3.4 Der bekannte Imaging Farbstoff Methoxy-XO4 eine vereinfachte Synthese und dessen Anwendung <i>in vivo</i>.	65
3.5 Fluoreszenz-Diagnostik für die Alzheimer-Demenz	91
3.5.1 Fluoreszente Retinasonden für die Alzheimer-Diagnostik	97
3.5.2 Fluoreszente Sonden für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel	114
3.6 Aufbau einer histologischen Evaluierung neuer fluoreszierender Farbstoffe	134
3.6.1 Anmerkungen zu der histologischen Färberroutine	135
3.6.2 Die verschiedenen untersuchten Farbstoffklassen im Überblick	137
3.6.2.1 Diverse Farbstoffstrukturen und ihre Färbeeigenschaften	137

3.6.2.2	Benzopyran oder Chromen abgeleitete Farbstoffe	140
3.6.2.3	Benzooxazol-, Benzothiazol-, Imidazolpyridin- und Imidazolpyridazin-basierte Farbstoffe	144
3.6.2.4	Die Methoxy-XO4 (BSc3924) analogen Bisstilbenfarbstoffe und Bisstilbenderivate auf der Basis von Pyrimidin	146
3.6.3	Ausschluss unselektiver Färbung durch den Vergleich mit anderen ähnlichen Pathologien wie Morbus Parkinson	154
3.6.4	Untersuchung und Färbung weiterer Gewebe mit eventueller Relevanz für die Diagnostik von Alzheimer-Demenz	157
3.6.4.1	Die Alzheimer-Demenz und das olfaktorische System	157
3.6.4.2	Die Alzheimer-Demenz und das Intestinum	161
3.7	Aufbau einer medium Zebrabärbling Eiproduktion für die Evaluation wichtiger Bioparameter von Substanzen.	164
3.7.1	Aufbau der Fischbeckenanlage	164
3.7.2	Nachzucht und Laichgewinnung vom Zebrabärbling	165
3.7.3	Der Laich des Zebrabärblings in Experimenten mit fluoreszierenden Farbstoffen	169
3.7.3.1	Versuche mit fluoreszierenden Farbstoffen am Laich des Zebrabärblings	170
3.8	Zusammenfassung	177
3.9	Ausblick	181
4.	Experimenteller Teil	184
4.1	Allgemeine Anmerkungen	184
4.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	186
4.2.1	AAV für die Darstellung der Methoxy-Bisstilbene	186
4.2.2	AAV für die Darstellung der Bisstilbenpyrimidine	186
4.2.2.1	AAV für die Darstellung der Bisstilbenpyrimidine (wasserfreie Variante)	186
4.3	Synthesen der hergestellten Verbindungen	187
4.3.1	Auszug der <i>Supporting Information</i> : „NSAID-derived γ -secretase modulators“	221
4.4	Histologie: Allgemeine Anmerkungen	230
4.4.1	Standard Färbeprotokoll für die Gewebeschnitte mit neuen Farbstoffen	230
4.4.2	Die histologischen Ergebnisse im Überblick	231
4.4.2.1	Histologie diverser kommerzieller Farbstoffe	232
4.4.2.2	Histologie diverser synthetisierter Farbstoffe	251
5.	Literaturverzeichnis	290
6.	Anhang	297

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
A β	A β -Plaques
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
AcOH	Essigsäure
AH	Ammonshorn
Aph1	<i>Anteriorpharynx defective-1</i>
APP	<i>β-amyloid precursor protein</i>
AS	Aminosäure
Astrof.	Astrozytenfortsätze
BACE	<i>β-amyloid cleaving enzyme</i>
BBB	<i>blood brain barrier</i> (Blut-Hirn-Schranke)
Bez.	Bezeichnung
Bow.	Bowman-Drüsen
BP	Bandpass
BSc	Boris Schmidt Substanzdatenbankeintrag
CBD	kortikobasale (oder corticobasale) Degeneration
COX	Cyclooxygenasen
CT	Computer-Tomographie
Cy	Cyclohexan
d	Dublett
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff: 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpf	<i>days post fertilisation</i> (Tage nach der Befruchtung)
EOAD	<i>early onset alzheimer disease</i> (Alzheimer-Patienten mit frühem Krankheitsausbruch)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat

Et ₂ O	Diethylether
Em	Emission
Ex	Excitation / Anregung
FITC	Fluoreszenzfarbstoff: Fluoresceinisothiocyanat
FT	Farbteiler
ges.	gesättigt
GSM	γ-Sekretase Modulator
Häm.	Hämoglobin
Hex	Hexan
hpf	<i>hours post fertilisation</i> (Stunden nach der Befruchtung)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IL	<i>Ionic Liquid</i> (ionische Flüssigkeit)
k.A.	keine Ausbeute
Kap.	Kapitel
Kat.	Katalysator
konz.	konzentriert
LP	Langpass
LOAD	<i>late onset alzheimer disease</i> (Alzheimer-Patienten mit spätem Krankheitsausbruch)
Lsg.	Lösung
Lsgm.	Lösungsmittel
m	Multiplett
M ⁺	Molekül-Kation
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i> Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen)
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
m/z	Verhältnis Masse / Ladung
NCT	Nicastrin
NFT	<i>neurofibrillary tangle</i> (Neurofibrilläre Bündel)
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)

NIR	Nah-Infrarot
NMP	N-Methylpyrrolidon
NSAIDs	Nichtsteroidale Antirheumatika
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PHF	<i>paired helical filaments</i> (paarige helikale Filamente)
Phbl.	Photobleiche
Pen	<i>Presenilin enhancer</i> (Präsenilin-Verstärker)
Ph	Phenyl
pK _s	dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PS	Presenilin
PSP	<i>progressive supranuclear palsy</i> (progressive supranukleäre Blickparese oder Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom)
quart.	Quartett
RIP	<i>regulated intra-membrane proteolysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s.	siehe
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Einzelphotonen-Emissions-Tomographie)
t	Triplett
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Tetramethylsilan
t _R	Retentionszeit
wei. Beob.	weitere Beobachtungen
zer. Angio.	zerebralen Angiopathien
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Demenz

Neben anderen neurodegenerativen Demenzen ist die Alzheimer-Demenz (AD) die am häufigsten auftretende Form.^[1] Die von Alois Alzheimer entdeckte, nach ihm benannte, noch immer nicht heilbare und zugleich tödlich verlaufende Krankheit gehört mit zu den Herausforderungen, die wir in den kommenden Jahrzehnten unter sozioökonomischen und medizinischen Aspekten bewerkstelligen müssen. Die geschätzte Zahl der Patienten liegt in Europa bei 7-8 Millionen, weltweit bei ca. 24 Millionen.^[1]

Die von der Krankheit betroffenen Menschen leiden unter verschiedenen kognitiven Symptomen (z. B. Gedächtnisstörungen, Desorientierung, Verwirrung), bestimmten Verhaltensauffälligkeiten (z. B. Schlaflosigkeit, Depression, Angstzustände, Unruhe) bis hin zu Wesensveränderungen als charakteristische Merkmale. Pathologische Merkmale dieser Krankheit sind extraneuronale Amyloid-Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) die *post mortem* im Gehirn der Alzheimerpatienten bei histologischen Untersuchungen gefunden werden (**Abb. 01**).^[2]

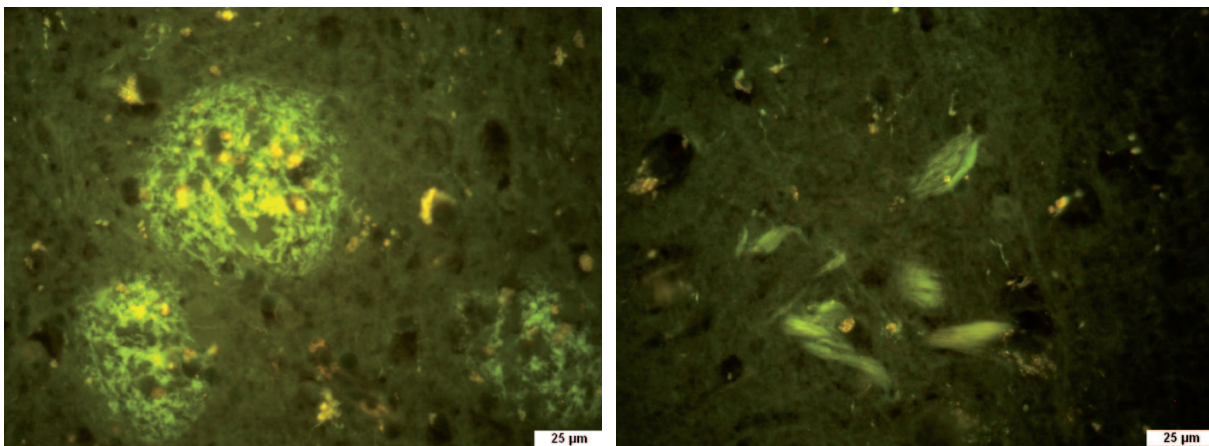


Abb. 01: Gehirnschnitt mit A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln in der Fluoreszenzfärbung mit Thioflavin S (**12**) (Gewebe: Hippocampus, Patient: männlich, Alter: 86J, AD, Klinikum Darmstadt).

Die Erforschung der AD wird von der Biologie bis hin zur Medizin in vielen verschiedenen Fachdisziplinen angegangen. In der biologischen Grundlagenforschung werden z. B. die möglichen Ursachen und eventuelle genetische Einflüsse untersucht. Aus den gewonnen Erkenntnissen werden Hypothesen erstellt, die für die Entwicklung validierbarer Diagnosen und entsprechender Therapien als Arbeitsgrundlage benötigt werden. Die verifizierbare und quantifizierbare Diagnose

am lebenden Patienten sowie die Suche nach einer medikamentösen Behandlung stehen dabei im Fokus der Medizinalchemie. In anderen Disziplinen liegt der Schwerpunkt in den gesellschaftlichen Herausforderungen der Alzheimer-Demenz und deren Lösung, z. B. in Bezug auf die Pflege und die Kosten, die das Gesundheitssystem leisten muss.^[3a,b]

Genetischer Hintergrund der AD. Auguste Deter, die Patientin, bei der Alois Alzheimer erstmalig diesen „eigenartigen Krankheitsprozess“ erforschte, starb im Alter von 56 Jahren.^[4] Dieser frühe Krankheitsausbruch wird als *early onset* AD (EOAD) klassifiziert und gehört zu den eher seltenen Fällen der AD (< 2%). Die genauere genetische Untersuchung dieser Patientengruppe hat allerdings viel zu dem ursächlichen Verständnis der Krankheit beigetragen, denn bei diesen Patienten finden sich Mutationen bestimmter Gene, die AD hervorrufen. Es handelt sich dabei um die Presenilin-Gene 1 und 2 (PSEN1 und PSEN 2) sowie um das β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP) auf Chromosom 21.^[5]

Ebenso kann auch das ApoE-Gen Risikofaktoren beinhalten. Zum Beispiel konnte das $\epsilon 4$ -Allel des ApoE-Genes in epidemiologischen Studien mit einem frühen Krankheitsausbruch und einem hohen Risiko, an einer AD zu erkranken, korreliert werden.^[6] Es war allerdings auffallend, dass von allen Untersuchten Patienten nur eine kleine Gruppe dieses Risiko-Allel hatte. Sie stammten alle aus der Gruppe der so genannten sporadischen Form. Dies bedeutet, dass der überwiegende Teil der Patienten dieses spezielle Risiko-Allel also nicht trägt. Das führt zu der begründeten Annahme, dass es weitere Risikofaktoren geben muss. Generell steigt zum Beispiel mit zunehmendem Alter das Risiko, an AD zu erkranken, ohne dass bisher geklärt ist, woran das ursächlich liegt.^[4] Zur Unterscheidung werden Patienten mit AD ab einem Alter von 65 Jahren als *late onset* AD (LOAD) Patienten bezeichnet.

Die Entstehung der amyloiden Plaques und der neurofibrillären Bündel (Abb. 01) mit den zugehörigen Hypothesen wird derzeit als Hauptarbeitsansatz bei der Diagnostik und Therapieentwicklung von AD verfolgt. Die zur Zeit gängige Amyloidhypothese besagt, dass die Hauptursache der AD die Akkumulation von amyloiden β -Peptiden im Zentralnervensystem ist. Bei diesen extrazellulären amyloiden Plaques handelt es sich um Ablagerungen aus proteolytischen Fragmenten des β -Amyloid-Vorläuferproteins. Dieses Protein wird über eine Fehlprozessierung in Aminosäurefragmente von vor allem $A\beta_{42}$ und $A\beta_{40}$ gespalten, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zur Aggregatbildung neigen und über eine komplexe Kaskade zu neuronaler Dysfunktion führen (**Abb. 02**).^[7]



Abb. 02: Die Hypothese der Amyloidkaskade bei der AD.

Die zurzeit gängige „Tau-Hypothese“ für Alzheimer-Demenz besagt, dass es sich bei den intrazellulären neurofibrillären Bündeln um Ablagerungen des mikrotubulinassoziierten Tau-Proteins handelt. Diese entstehen durch abnorme Hyperphosphorylierung aufgrund von Ungleichgewichten in der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen mit anschließender Aggregation dieser Proteinfragmente und einhergehender neuronaler Dysfunktion.^[8] Als weitere Folgen dieser Ablagerungen werden die fortschreitende Schädigung der Neuronen, die Unterbrechung der metabolischen und ionischen Homöostase, oxidativer Stress sowie Veränderungen in der Aktivität von Kinasen angesehen.

Therapie und Medikamente. Es gibt bis heute kein Medikament, das die Alzheimer-Demenz heilen kann. Es gibt aber Behandlungen, die teilweise zu kognitiven Verbesserungen für die Patienten führen. Derzeit in Phase IV zur Therapie eingesetzte Medikamente sind Tacrin®, Donepezil®, Rivastigmin®, Memantin® und Galantamin®.^[9] Bei Tacrin®, Donepezil®, Rivastigmin® und Galantamin® handelt es sich um Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer). Sie verhindern den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin, der bei Alzheimer-Demenz-Patienten nicht mehr ausreichend vorhanden ist. Durch das Absterben der Nervenzellen bei der Alzheimer-Demenz wird diesem Mangel an Botenstoff verursacht. Die Therapie mit AChE-Inhibitoren vermindert die Symptome im frühen Stadium, da sie die Signalweiterleitung zwischen den

noch vorhandenen Nervenzellen aufrechterhält, jedoch ein weiteres Absterben mit resultierender Gehirnatrophie aber nicht verhindert. Die Therapie mit Memantin®, einem *N*-Methyl-*D*-Aspartat Rezeptor-Antagonist (NMDA), führt auch bei schwerer Alzheimer-Demenz noch zu symptomatischen Verbesserungen. Die bei der Alzheimer-Demenz am synaptischen Spalt auftretenden Disregulationen führen unter anderem dazu, dass ein gestörter NMDA-Rezeptor durch Überexpression von Glutamat permanent Kalzium-Ionen in die Zelle einlässt. Diese erhöhte Kalziumkonzentration macht es der Zelle schwer, ankommende Aktionspotentiale zu differenzieren. Langfristig ist diese Disregulation für die Zelle destruktiv und führt zum Zelltod. Die Blockade dieses schädlichen Mechanismus verbessert die kognitiven Fähigkeiten der Patienten und schützt die Zelle, stellt aber keine kurative Therapie dar.^[10]

Es werden zur Zeit weitere Wirkstoffklassen zur Behandlung von Alzheimer-Demenz untersucht, darunter Agonisten der nikotinergen und muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren, Antioxidantien, Aktivatoren des Neurotrophin-Signalweges sowie des Nervenwachstumsfaktors (NGF). Ebenso werden entzündungshemmende Medikamente wie Cyclooxygenase-1- (COX-1) oder COX-2-Inhibitoren untersucht, da Entzündungsvorgänge im Gehirn von Alzheimer-Demenz-Patienten beobachtet werden.^[9] Des Weiteren sind auch Konzepte für eine Immunotherapie der Alzheimerkrankheit in der Entwicklung.^[9] Basierend auf der Amyloid-Hypothese wird durch passive Immunisierung oder aktive Impfung ein Antikörpertiter gegen verschiedene Epitope des A β -Peptids generiert. Erste klinische Studien mussten allerdings wegen starker Nebenwirkungen abgebrochen werden. Dennoch ist dieses Konzept aufgrund verschiedener Ergebnisse in Tierexperimenten ein viel versprechender Therapieansatz.^[11]

1.1.1 Störungen im β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP) Metabolismus

Der gestörte β -Amyloid-Vorläuferprotein Metabolismus ist für die pathogenen A β -Plaque-Ablagerungen verantwortlich. Aufgrund umfangreicher Studien an familiären *early onset* Alzheimer-Demenz-Patienten konnten mehr als 25 Alzheimer-Demenz auslösende Mutationen auf diesem Gen identifiziert werden. Zum Beispiel bedingt eine Verdopplung des APP Gens allein eine *early onset* Alzheimer-Demenz. Dies erklärt, warum Patienten mit Trisomie 21 (Down Syndrom) bei hinreichendem Alter immer eine Alzheimer-Demenz entwickeln. Sie haben auf ihrem Chromosom 21 ein Triplikat des APP Gens vorliegen.^[12]

Das aus der Genexpression des APP-Gens hervorgehende β -Amyloid-Vorläuferprotein ist ein membranständiges Protein mit einer großen extrazellulären Domäne und einer kleinen cytoplasmatischen Region. Über eine zweistufige Sekretasenkaskade kommt es zur Freisetzung von β -Amyloid ($A\beta$). Die eigentliche physiologische Funktion vom APP ist bis heute unklar. Einige Studien deuten darauf hin, dass die extrazelluläre Domäne eine Funktion als neurotropher Faktor haben könnte (z.B.: Metallbindung, autokrine und parakrine Funktion bei der Wachstumsregulierung). Ebenso wird eine zelladhäsive Funktion mit Einfluss auf diverse neuronale Aktivitäten diskutiert.^[12]

Die Bildung des $A\beta$ -Proteins ist die bis heute am besten verstandene Eigenschaft des β -Amyloid-Vorläuferproteins. Die APP-Prozessierung untergliedert sich in zwei Pfade: den normalen nicht-amyloidogenen Weg und den amyloidogenen Weg, der zur toxischen Spezies führt (**Abb. 03**).

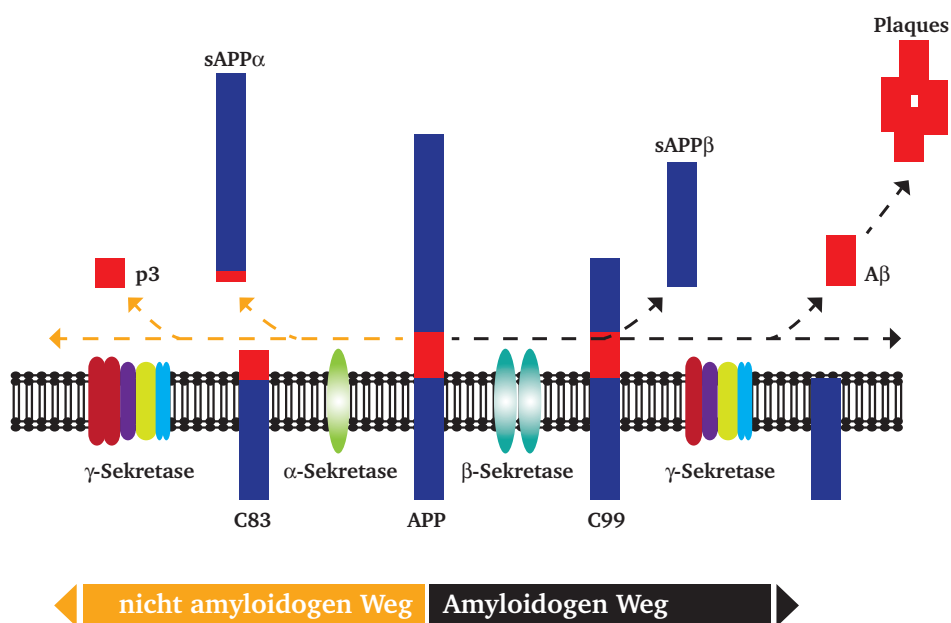


Abb. 03: Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP über den amyloiden und nicht-amyloiden Weg.

Die Prozessierung beim gesunden Menschen findet über den nicht-amyloiden Weg statt. Dabei wird APP zunächst von der α -Sekretase, einer membrangebundenen Metalloprotease, in der $A\beta$ -Sequenz geschnitten. Es resultiert das lösliche sAPP α -Fragment und das membrangebundene Fragment C83. Bei der anschließenden Spaltung des C83 Fragments durch die membrangebundene γ -Sekretase, eine Aspartylprotease, wird das nicht zur Aggregation neigende Peptid p3 freigesetzt. Bei Alzheimer-Demenz-Patienten erfolgt die Prozessierung zusätzlich

über den amyloidogenen Weg. Dabei wird APP zunächst von der β -Sekretase, BACE 1 (*β -site APP-cleaving enzyme*), in ein membrangebundenes intrazelluläres Peptidfragment C99 sowie ein extrazelluläres sAPP β Fragment gespalten. Durch die anschließende Spaltung der γ -Sekretase an der Transmembran-Domäne entstehen A β -Peptidfragmente unterschiedlicher Länge von 38-43 Aminosäuren (AS). Etwa 90% der Fragmente bestehen aus A β_{40} , wohingegen A β_{42} nur etwa 10% ausmachen, sowie kleinere Mengen von A β_{38} und A β_{3-40} . Die Neigung zur anschließenden Aggregation haben generell die A β -Fragmente mit mehr als 40 Aminosäuren, dabei fällt auf, dass je länger ein A β -Fragment ist, desto besser und schneller aggregiert es zu pathogenen Oligomeren und in der Folge zu A β -Plaques. Inzwischen werden besonders die frühen Oligomere von A β_{40-42} als stark neurotoxische Spezies angesehen, A β_{38} hingegen nicht.^[12]

Für die Inhibition oder Modulation sind die β - oder γ -Sekretase folglich interessante therapeutische Targets. Es stellte sich leider bei BACE heraus, dass APP nicht dessen einziges Substrat ist und somit eine Inhibition dieses Enzyms nicht unproblematisch ist, da dadurch andere für den Zellstoffwechsel relevante Prozesse zum Erliegen kämen. Für die γ -Sekretase gilt dies natürlich auch, allerdings besteht hier die Möglichkeit, die Totalinhibition durch eine allosterische Regulation zu umgehen. Die dafür eingesetzten γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) regulieren den APP-Metabolismus dahingehend, dass vermehrt A β_{38} und damit weniger toxisches A β_{42} gebildet wird.^[13] Für die Diagnostik stellen diese Ablagerungen zurzeit neben den neurofibrillären Bündeln die Haupttargets dar.

1.1.2 Entstehung und Funktion von neurofibrillären Bündeln (NFTs) des Tau-Proteins

Ein weiteres charakteristisches Merkmal in Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten sind die NFTs, die aus paarigen helikalen Filamenten (PHFs) des Tau-Proteins bestehen. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAPs) und hat mehrere Mikrotubuli-Bindungsdomänen. Mikrotubuli-assoziierte Proteine bestehen aus α - und β -Tubulindimeren und sind Bestandteile des Cytoskeletts. Weiterhin sind sie an Zellteilungsmechanismen sowie an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. Mikrotubuli-assoziierte Proteine stabilisieren die Mikrotubuli und stimulieren die Tubulindimerisierung im Gehirn.

Das Tau-Protein kann in drei Domänen unterteilt werden: einen aziden N-Terminus, einen basischen Mittelteil, reich an Prolin, und eine ebenfalls basische „repeat“ Domäne am C-Terminus. Es sind sechs verschiedene Tau-Isoformen mit Längen zwischen 352 und 441 Aminosäuren im menschlichen

Zentralnervensystem (ZNS) zu finden. Sie entstehen durch unterschiedliches Spleißen der mRNA während der Genexpression von Abschnitten des Chromosoms 17q21.^[14] Sie unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von ein oder zwei N-terminalen Einsätzen sowie durch den Ein- oder Ausschluss der zweiten oder vierten pseudo-„repeat“ Domäne am C-Terminus mit jeweils ca. 31 Aminosäureresten.^[15] Die Hauptmenge an Tau ist im Bereich des Axons lokalisiert.

Im Verlauf der Alzheimer-Demenz kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen. Sie regulieren die Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und dem Tau-Protein. Die Tau-Proteine sind nicht länger an die Mikrotubuli gebunden und aggregieren zu paarigen helikalen Filamenten, die zu neurofibrillären Bündeln heranwachsen (**Abb. 04**). Die Mikrotubuli sind dadurch destabilisiert und zerfallen.^[16] Dies hat zur Folge, dass sie ihre wichtigen Transportfunktionen nicht mehr erfüllen können, sodass die Nervenzelle verkümmert und schließlich abstirbt.



Abb. 04: Darstellung des dynamischen Gleichgewichts zwischen MAPs und freiem Tau-Protein.

Die dabei hauptsächlich beteiligten Kinasen sind die Glykogen Synthetase Kinase 3 (GSK-3), die Cyclin-abhängige Kinase 5 (*cyclin dependent kinase* CDK5), die zyklische Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase (cAMP), die *mitogen-activated protein*-Kinase (MAPK), die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) und die Mikrotubuliaffinität-regulierende Kinase (MARK).^[17] Es konnte gezeigt werden, dass speziell eine Phosphorylierung an Ser214 und Ser262 des MAPs zu einem drastischen Abfall der Bindungsaffinität des Tau-Proteins am Mikrotubulus führt und dessen Ablösung zur Folge hat.^[18]

Die neurofibrillären Bündel sind strukturell noch nicht vollständig aufgeklärt, haben aber ebenso wie die A β -Plaques charakteristische β -Faltblatt Sekundärstrukturen.^[19] Fibrilläre oder amorphe Aggregate von hyperphosphoryliertem Tau werden auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Zu diesen Tauopathien zählen z.B. die Frontotemporale Demenz, Morbus Pick, die progressive supranukleäre Blickparese (PSP: *progressive supranuclear palsy*, oder Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom), die kortikobasale Degeneration (CBD) und Parkinsonismus mit Mutation auf dem Chromosoms 17.^[17, 20] Für all diese Krankheiten gibt es bis heute ebenfalls noch keine ursächliche Behandlung sondern nur bedingte symptomatische Therapien.

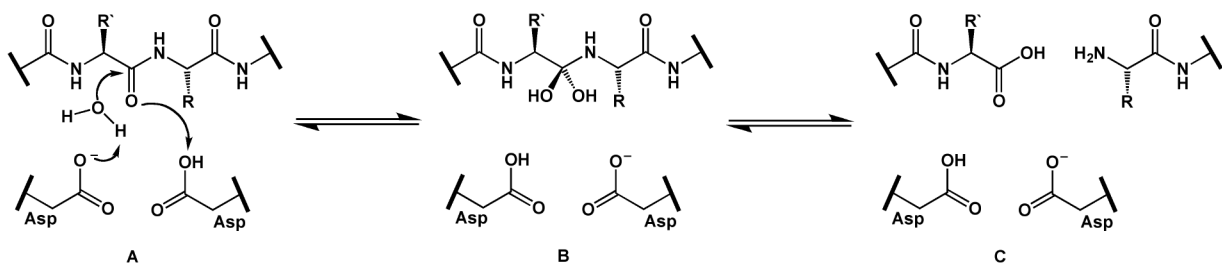
Für die Entwicklung von Therapeutika und diagnostischen Markern sind die Tau-Proteinablagerungen somit wichtige Targets. Die funktionalen Entwicklungsstrategien sind folgende:

- Inhibition der abnorm hohen Phosphorylierung durch Modulation der beteiligten Kinasen
- Entwicklung von Aggregationsinhibitoren, die paarige helikale Filamente und neurofibrilläre Bündel verhindern und auflösen
- Stimulation Mikrotubuli stabilisierender Faktoren
- Tau-Immunotherapien
- Antiinflammationstherapie, da in der Folge Entzündungsprozesse im erkrankten Neuron auftreten
- Markierung der paarigen helikalen Filamente und neurofibrillärer Bündel, da die Verteilung und Dichte dieser Ablagerungen im Gehirn der Patienten besser mit dem kognitiven Stadium der Krankheit zu korrelieren scheinen.^[21]

1.1.3 Die γ -Sekretase als Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer

Die γ -Sekretase ist am letzten entscheidenden Schritt der A β -Amyloid Sequenzierung involviert. Sie ist, wie auch die β -Sekretase, eine Aspartylprotease. Die Substrate werden im aktiven Zentrum über einen Säure-Base-Mechanismus hydrolysiert (**Schema 01**). Es wird dabei die zu spaltende Amidbindung von einem Wassermolekül angegriffen, das durch ein zweites Aspartat deprotoniert und damit aktiviert wird (A). Diesem konzertierten Angriff folgt die Spaltung (C) über das aktivierte Amid (B).

Eine Besonderheit hierbei ist, dass die γ -Sekretase in der hydrophoben Umgebung der Membran lokalisiert ist. Das für den Spaltungsmechanismus benötigte Wasser muss folglich in dieser wasserarmen Umgebung über aktiven Transport eingebracht werden.^{[22] [23] [24]}



Schema 01: Mechanismus der γ -Sekretase Amyloid-Sequenzierung.

Die γ -Sekretase ist ein membranständiger Enzymkomplex, der aus vier Proteinen aufgebaut ist (**Abb. 05**): Presenilin (PS), Nicastrin (NCT), Anteriorpharynx defective-1 (Aph-1) und Presenilin enhancer-2 (Pen-2). Diese bilden den Kern des γ -Sekretase-Komplexes.^[25] Untersuchungen ergaben, dass PS eine hydrophile Pore in der Transmembrandomäne (TMD) 6 und 7 ausbildet und darin die katalytisch aktiven Aspartat-Reste beherbergt.^[26a,b] Des Weiteren sind die PS auch für die Aktivität verantwortlich, Pen 2 wird als ein Cofaktor in der Regulation und Aktivierung des γ -Sekretase-Komplexes angesehen.^[27] NCT ist ein großes Singlepass-Transmembran-Protein von 130 kDa, welches als PS-bindendes Protein identifiziert wurde und an der extrazellulären Domäne verankert ist. Es besteht aus einer großen extrazellulären *N*-terminalen und einer kleinen intrazellulären *C*-terminalen Domäne. NCT kann in zwei Formen vorliegen: „reif“ und „unreif“, je nach Glykosylierungsgrad, was bei der späteren Endoproteolyse die Bindung an das PS-Holo-protein beeinflusst und unterstützt.^[28] Die große extrazelluläre Domäne hat eine wichtige Funktion bei der Substraterkennung und dem Substrateintritt in den γ -Sekretase-Komplex.^[29] Aph 1 ist ein Multipass-Membran-Protein und spielt eine Rolle bei der Stabilisierung, Bildung und dem Membrantransport des γ -Sekretase-Komplexes.^[30] Gebildet wird der γ -Sekretase-Komplex

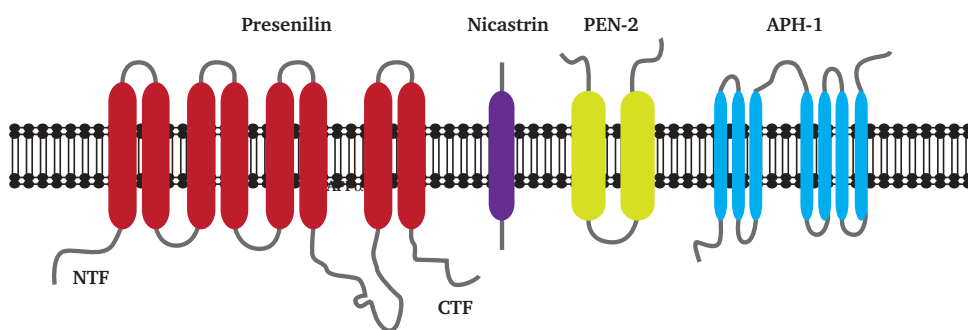


Abb. 05: Schematische Darstellung der wichtigen Proteine des γ -Sekretase Komplexes.

im endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach dem Modell von Zhou et. al. läuft dies wie folgt ab: Nicastrin und Aph-1 bilden einen Subkomplex, der in das ER eintritt. Zusammen mit dem PS entsteht dort ein Trimer. Im Golgi-Apparat erfolgt eine vollständige Glykosylierung¹ von NCT. Beim Eintritt von Pen-2 aktiviert sich der γ -Sekretase-Komplex durch die induzierte Endoproteolyse von PS.^[29] Die Endoproteolyse von PS resultiert in der Ausbildung von N- und C-terminalen Fragmenten, die eines der katalytisch aktiven Aspartate enthalten. Das aktive PS liegt dann als Heterodimer vor, wobei auch das Monomer aktiv ist.^[31] Es wurden noch weitere Proteine identifiziert, die mit dem γ -Sekretase-Komplex schwach assoziiert sind und regulative Effekte zu haben scheinen, aber für die A β -Prozessierung von nur geringer Relevanz sind.^[29]

Die Inhibition der γ -Sekretase hätte eine Reduktion aller A β -Peptid-Fragmente zur Folge. Nach der gängigen Amyloid-Hypothese ist sie damit ein interessantes Target für die Behandlung der Alzheimer-Demenz. Es hat sich leider auch herausgestellt, dass die γ -Sekretase eine große Anzahl an weiteren wichtigen Substraten prozessiert. Das Risiko, durch eine Totalinhibition unerwünschte Nebenwirkungen zu generieren, ist damit groß.^[32] Dennoch wurden eine Vielzahl an Inhibitoren entwickelt. Dabei sind folgende Klassen abgedeckt worden: die peptidischen, die semi-peptidischen und die nicht-peptidischen mit verschiedenen Wirkmechanismen auf den γ -Sekretase Komplex und seine Prozessierungskette. Sie wurden überwiegend aus *hits*, die bei Hochdurchsatz-Screening Verfahren gefunden wurden, entwickelt. Einige Substanzen sind bereits in der klinischen Phase II, andere zeigten keine kognitiven Verbesserungen oder hatten starke Nebenwirkungen.^{[24] [25] [33]}

Neben den γ -Sekretaseinhibitoren hat sich in den letzten Jahren der Forschungsschwerpunkt zu den γ -Sekretase Modulatoren (GSM) weiterentwickelt.^[34] Dahinter steht die Idee, die toxischen A β -Spezies bei Erhalt der Sekretasefunktion für andere Substrate zu minimieren und damit maximalen Effekt bei minimalen Nebenwirkungen zu erzielen. Da noch keine Röntgenstruktur der γ -Sekretase erhalten werden konnte, gibt es leider nicht die Möglichkeit, ein computerunterstütztes strukturbasiertes Wirkstoffdesign durchzuführen.

Im Jahre 2005 wurde von Merck Sharp & Dohme ein selektiver GSM (1) vorgestellt, dem weitere GSMs folgten (2 und 3) (**Abb. 06**).^{[35] [36a,b]} Auffallend für diese Modulatorklasse ist die Carbonsäuregruppe. Kennzeichnend für die Modulatoren in ihrem Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase ist, dass lediglich eine Verschiebung der Prozessierung hin zu kleineren Fragmenten beobachtet wird, die entstehende A β -Fragment-Gesamtlast aber konstant bleibt.

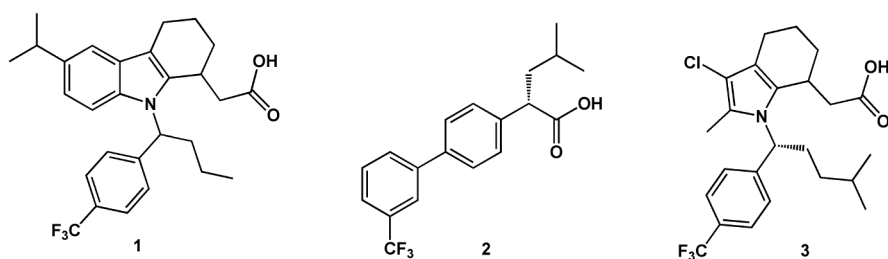


Abb. 06: Erste GSMs mit Carbonsäuremotiv.

Diese Entdeckung erfolgte aufgrund zweier Auffälligkeiten. Im Gehirn von Alzheimer-Demenz-Patienten konnten eine Reihe von Entzündungsvorgängen beobachtet werden. Außerdem wurde bei Rheumapatienten, die chronische Konsumenten der Wirkstoffklasse der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR oder NSAID, *non steroidal anti inflammatory drugs*) sind, eine signifikant niedrigere Erkrankungsrate an Alzheimer-Demenz festgestellt.^[37] Einige Wissenschaftler sehen diese Entzündungsvorgänge auch als Auslöser einer Alzheimer-Demenz, die laut dieser Hypothese dann nur eine Art Immunantwort in Form von neurofibrillären Bündeln und A β -Plaques darstellt.^[38] Die bekanntesten Vertreter dieser Wirkstoffklasse der NSAIDs wie R-Flurbiprofen (4), Sulindac-S (5) oder Ibuprofen (6) können den Fortgang einer Alzheimer-Demenz hemmen und zeigen auch modulatorische Wirkung (Abb. 07).^[39]

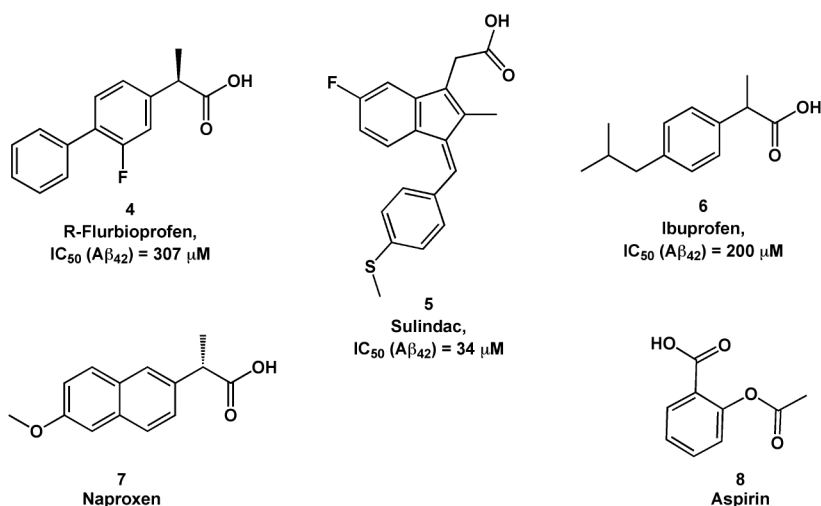


Abb. 07: NSAIDs mit und ohne modulatorischer Wirkung.

Dies ist allerdings nicht bei allen NSAIDs der Fall, so haben beispielsweise Naproxen (7) und Aspirin (8) keinen Einfluss auf die A β -Produktion. Carprofen (9) hingegen inhibiert die Bildung aller A β -Peptidfragmente (**Abb. 08**). In Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass NSAID-abgeleitete GSMs selektiv die Prozessierung der γ -Sekretase inhibieren.^{[39] [40]}

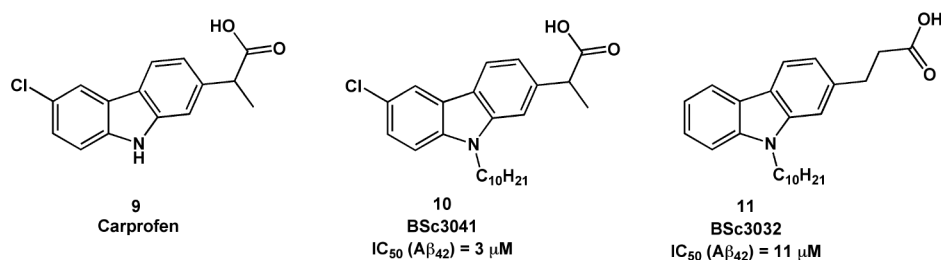


Abb. 08: GSMs aus der Arbeitsgruppe Schmidt.

Im Jahr 2008 endete die klinische Phase III Studie des NSAIDs 4 (Tarenflurbil bzw. R-Flurbiprofen) leider ohne signifikante kognitive Verbesserungen. Dennoch sind GSM auf der Basis von NSAIDs wichtige Leitstrukturen für weitere Entwicklungen. Die Bioverfügbarkeit war in den beschriebenen Studien, trotz hoher Dosierung, im Gehirn nur mäßig.^{[41] [42]} Die Steigerung der Aktivität und auch die Verbesserung der Bioverfügbarkeit stehen folglich im Fokus weiterer Entwicklungen.

Ausgehend vom Grundgerüst des NASID Carprofens (9), welches als moderater γ -Sekretase Inhibitor wirkt, wurden in der Arbeitsgruppe Schmidt GSMs entwickelt. Dabei wurden besonders zwei Funktionalitäten als notwendig erachtet, zum einen die Carbonsäurefunktionalität, zum anderen ein lipohiler Rest definierter Länge. Die Säurefunktionalität ist dabei wahrscheinlich für eine Interaktion mit dem Substrat und der lipophile Rest für eine bestimmte räumliche Orientierung in der Membran verantwortlich.^[43a,b] Ausgehend von diesen Erkenntnissen konnten Carbazolderivate (10, 11) mit ähnlichen Aktivitäten bezüglich der γ -Sekretasemodulation hergestellt werden (**Abb. 08**).^[44]

1.2 Diagnose und Imaging

Die Suche nach Wirkstoffen, die die Symptome von Alzheimer-Demenz lindern oder den Krankheitsverlauf verzögern sowie die Entwicklung einer heilenden Therapie, wird sowohl wissenschaftlich als auch politisch mit Nachdruck angegangen. Voraussetzung dafür ist die Möglichkeit einer frühen und sicheren Diagnose sowie einer eindeutigen Nachverfolgung der Entwicklung und der Schwere der Krankheit.

Eine genaue Diagnose anhand biopathologischer Strukturen ist derzeit nur *post mortem* durch histopathologische Untersuchungen des Hirngewebes möglich. ^[2, 45] Für eine klinische Differenzialdiagnose und die Nachverfolgung des Krankheitsverlaufes werden derzeit die im Folgenden beschriebenen diagnostischen Methoden herangezogen. Das gängigste Verfahren in der Entwicklung und Überprüfung therapeutischer Ansätze sind verhaltenspharmakologische Studien. Dabei wird die Schwere der Demenz und der Grad der neuronalen Beeinträchtigung des Patienten anhand kognitiver Tests evaluiert. Am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln wurde zum Beispiel ein als viel versprechend bewerteter kognitiver Test entwickelt. Er wird als *rapid dementia screening test* (RDST) bezeichnet und umfasst zwei Aufgabenteile. Den einen Teil bildet eine „Wortgenerierungsaufgabe“ zu einem Oberbegriff, der andere Teil ist eine „Zahlentranskodierungsaufgabe“ von Text in Ziffern oder umgekehrt. Die Treffsicherheit dieses Tests lag bei Patienten mit leichter bis mittlerer Alzheimer-Demenz bei 80% korrekt Klassifizierten, was durch eine *post mortem* durchgeführte histologische Untersuchung verifiziert wurde. ^[46]

Eine Verdachtsdiagnose basierend auf solchen Verhaltenstest wird durch weitere Untersuchungen differenziert und validiert. Es werden grundsätzlich zwei Diagnosearten unterschieden, die invasiven und die nichtinvasiven. Die Invasivität bezieht sich sowohl auf die physischen Belastungen als auch auf die Risiken, die durch die Untersuchungen für den Patienten entstehen. Die bildgebenden Verfahren können teilweise eine Verdachtsdiagnose bestätigen oder weitere Hinweise für eine Ausschlussdiagnose liefern. Der behandelnde Arzt erhält durch sie einen Eindruck vom Hirngewebe der Patienten und kann eventuelle krankhafte Veränderungen erkennen. Als bildgebende Verfahren finden die Computer-Tomographie (CT), die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT) Anwendung. ^[47]

Im folgenden Kapitel 1.2.1 werden diese verfügbaren Verfahren näher erläutert. Bei diesen Verfahren werden teilweise Liganden und andere Kontrastmittel für die jeweiligen Pathologien eingesetzt. Je nach Verfahren ist die Auflösung und Selektivität unterschiedlich. Im konkreten Fall von Alzheimer-Demenz sind z. B. die in der PET verwendeten A β -Liganden dahingehend von Nachteil, dass es teilweise zu unselektiver Bindung an weiße Hirnsubstanz und damit zu schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen kommt.^[48a] Es stagnierte bei wiederholten Messungen auch die PIB-Anreicherung (15), obwohl der kognitive Abbau bei den AD-Patienten voranschreitet.^[48b] Leider korreliert auch die pathologische A β -Belastung nicht konsequent mit dem Schweregrad einer Demenz.^[49] Eine weitere Möglichkeit der Differenzialdiagnose ist die Messung und Korrelation der Konzentration bestimmter Biomarker im Blutplasma oder in der Zerebrospinalflüssigkeit.^[50] Dabei wird zum Beispiel der A β -Titer in der *Liquor cerebrospinalis* (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) gemessen. Dafür muss eine invasive, nicht unkritische Rückenmarkspunktion, vorgenommen werden, obwohl es derzeit noch keine hinreichende genaue Korrelation zwischen dem Grad der Demenz und dem A β -Titer gibt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es allen Verfahren derzeit noch an hinreichender Exaktheit in der Detektion der speziellen biopathologischen Eigenschaften der Alzheimer Demenz für eine sichere Diagnose mangelt. Aus diesem Grund sind hier Entwicklungen im Bereich der Marker und auch der Geräte nötig, auch gerade im Hinblick darauf, dass sie teilweise nicht routinemäßig an Kliniken verfügbar sind.

Die Entwicklung der Marker geht von den derzeit validen histologischen Parametern aus: das sind die Atrophie des Hirngewebes sowie die Belastung bestimmter Hirnregionen mit neurofibrillären Bündeln und A β -Plaques.^[45] Die in der Histologie eingesetzten Marker färben auf den dafür untersuchten Gewebeproben die Alzheimer-Demenz-spezifischen Pathogene an und werden über einen Dichteschlüssel dem Schweregrad der Krankheit zugeordnet.^[2] Es werden zur Anfärbung entweder Antikörper oder β -Faltblattaaffine Farbstoffe wie Thioflavin S (12) oder Congorot (13), eingesetzt (**Abb. 09**).

Es ist daher von großem Interesse selektive Marker zu entwickeln, die in Kombination mit einem entsprechenden Verfahren sowohl den Verlauf als auch die frühen Gehirnveränderungen möglichst vor dem Auftreten beeinträchtigender kognitiver Defizite einer Diagnose zugänglich zu machen.

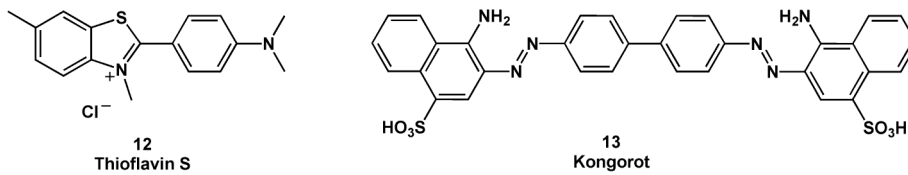


Abb. 09: In der Histologie etablierte Farbstoffe (siehe auch **Abb. 01**).

1.2.1 Die bildgebenden Verfahren für die Alzheimer-Demenz im Überblick

Die bereits angesprochenen bildgebenden Verfahren, die derzeit an Kliniken verfügbar sind, gehören zu den nichtinvasiven Verfahren, wobei die aus den Ergebnissen möglichen diagnostischen Aussagen unterschiedlich sind.^[47] Diese Verfahren unterscheiden sich auch durch die bei der Untersuchung für den Patienten entstehenden physischen und psychischen Belastungen. Der behandelnde Arzt muss dabei von Fall zu Fall entscheiden, mit welcher Kombination an Untersuchungen valide Diagnosen möglich und zumutbar sind.

Die Computer-Tomographie (CT) ist eine spezielle Röntgentechnik. Sie erzeugt aus wiederholt aufgenommenen Röntgenbildern eine schichtweise Abbildung des Gehirns oder der jeweiligen Körperregion. Ein Vorteil des Verfahrens ist eine genaue Lokalisation bestimmter Befunde durch die Schichtaufnahmen. Es kann dabei meist ohne Kontrastmitteln gearbeitet werden. Der Nachteil der CT ist, dass eine Alzheimer-Demenz erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden kann. Es wird die starke Hirnatrophie als Folge der neuronalen Degeneration festgestellt (**Abb. 10**). Meist sind die kognitiven Defizite der Patienten allerdings zu diesem Zeitpunkt schon weit vorangeschritten.^[51] Die CT dient deshalb bei der Untersuchung von Demenzpatienten meist dem Ausschluss anderer Ursachen, wie zum Beispiel Hirnblutungen, Schlaganfall, Tumoren oder Entzündungen.

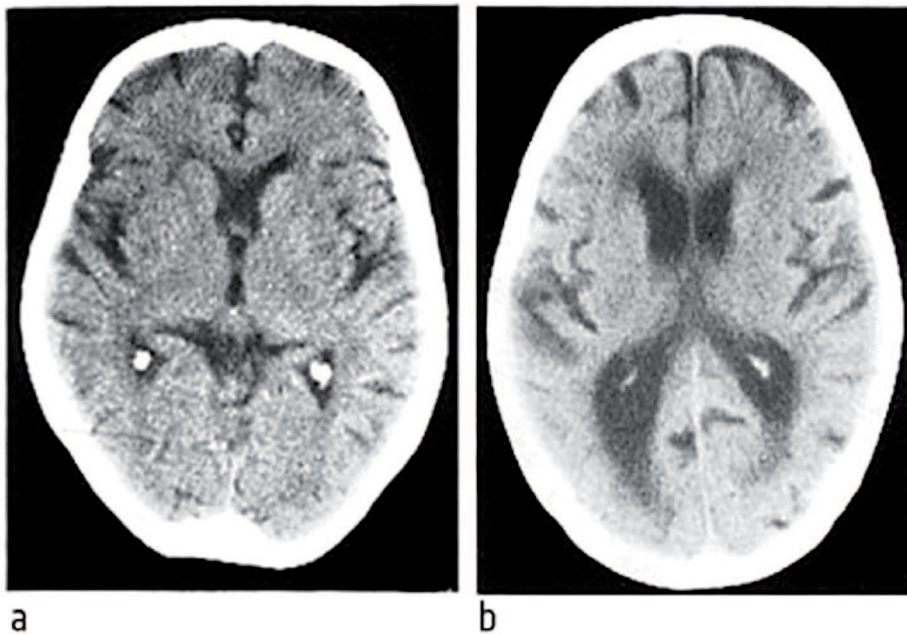


Abb. 10: CT des Großhirns eines gesunden älteren Menschen (a) und eines Patienten mit Alzheimer-Demenz (b).^[47]

Die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ist ein Verfahren, das wie die CT Schnittbilder der jeweiligen Region liefert. Dabei wird allerdings nicht Röntgenstrahlung verwendet, sondern man nutzt die unterschiedlichen Relaxationszeiten verschiedener Gewebearten in einem starken Magnetfeld aus. Das basiert auf der speziellen Eigenschaft des Kernspins von Atomen, sich im Magnetfeld auszurichten. Wenn man dieses Verhalten in einem starken Magnetfeld untersucht, kann man Rückschlüsse auf die atomare Umgebung schließen. Dabei werden für besseren Kontrast entsprechende Mittel verabreicht, die Einfluss auf die Spinrelaxation nehmen.^[51] Der Vorteil des Verfahrens ist die durch wiederholte Aufnahmen sehr exakte Verfolgung der Atrophie im Gehirn des Alzheimer-Demenz-Patienten. Gleichzeitig kann man andere Faktoren wie z. B. Hirnblutungen ausschließen. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, die Abnahme des Hirnvolumens erst spät und darüber hinaus auch beim gesunden alternden Menschen zu beobachten und dadurch sind die gewonnen Daten mit einer hohen Varianz belastet.^[47] Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist, dass starke Magnetfelder benötigt werden, was den Einsatz großer und damit teurer Magnete erfordert und bei Patienten mit Metallimplantaten, metallischem Zahnersatz und Herzschrittmachern nicht angewandt werden kann. Zudem sind diese Anlagen oft nur in großen Praxen und Kliniken vorhanden.

Positronen-Emissions-Tomographie und Einzelphotonen-Emissions-Tomographie

sind Verfahren, die durch Radiopharmaka ermöglicht werden, wobei es sich um radioaktiv markierte Moleküle handelt. Diese senden bei ihrem radioaktiven Zerfall Positronen aus, die entsprechend orts aufgelöst detektiert werden und daraus Detailbilder errechnet werden können (**Abb. 11**).^[52a,b] Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist der Erhalt von Information auf molekularer Ebene, zum Beispiel von Stoffwechselprozessen. Entscheidend für die erhaltenen Informationen ist die Qualität der Probe, wobei die Bindung an das Target sowie die Affinität, Spezifität und die Halbwertszeit eine wichtige Rolle spielen.

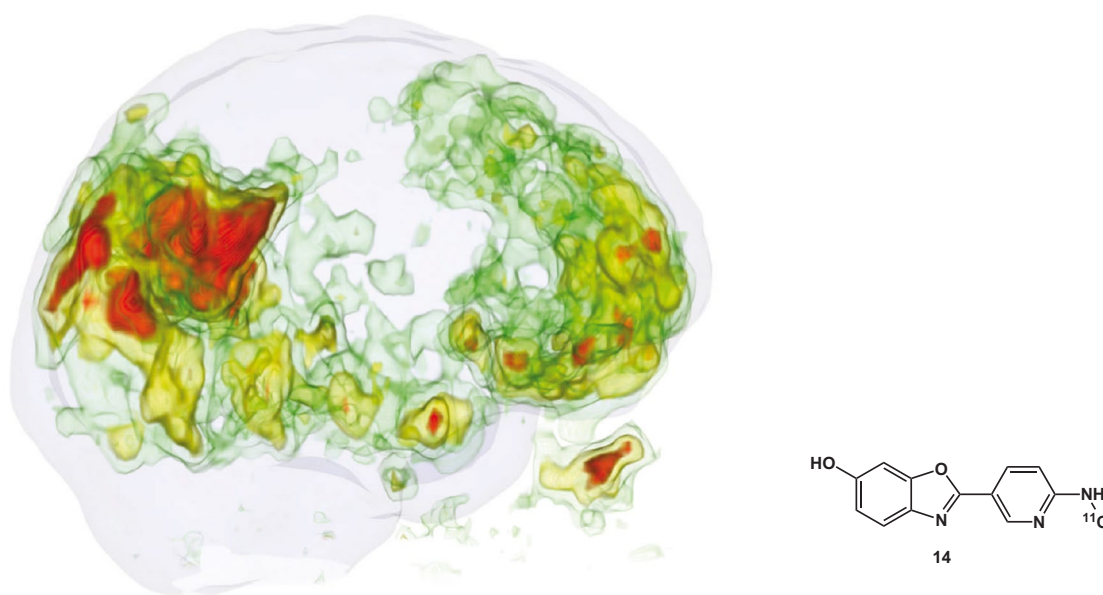


Abb. 11: PET Scan eines menschlichen Hirns mit AD PET-Probe **14** (Astra Zeneca).^[52b,c]

Die Halbwertszeit hängt von den für die radioaktive Markierung verwendeten Isotopen ab. Die gängigen dafür verwendeten Isotope sind mit den zugehörigen Halbwertszeiten und ihrer jeweiligen spezifischen Aktivität in **Tabelle 01** aufgeführt.^[53] Ein Vorteil dieser Isotope ist, dass sie durch etablierte Syntheschemie in die meist kleinen organischen Markermoleküle eingebracht werden können.^[52a] Da die Isotope meist sehr kurzlebig sind, muss das Radiopharmakon vor Ort synthetisiert werden. Die damit verbundene Infrastruktur vom Radiochemielabor mit Aufreinigungs- und Analysentechnik über ein Synchrotron für die Isotopenherstellung bis hin zu dem eigentlichen PET und SPECT Scanner, machen diese Verfahren zu sehr teuren und nicht routinemäßig vorzufindenden Untersuchungstechniken in Kliniken.

Radio Nukleotid	Halbwertszeit	Zerfallsart	Maximale spezifische Aktivität / GBq / mol
^{11}C	20.4 min	β^+ (99%)	3.4×10^{11}
^{13}N	9.96 min	β^+ (99%)	6.9×10^{11}
^{15}O	2.07 min	β^+ (99.9%)	3.4×10^{12}
^{18}F	109.7 min	β^+ (97%)	6.3×10^{10}
^3H	12.3 Jahre	β^- (100%)	1.1×10^6
^{14}C	5730 Jahre	β^- (100%)	2.3×10^3
^{123}I	13 h	γ (Elektroneneinfang)	$2.5\text{-}4.5 \times 10^{11}$
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	γ (isomerer Übergang)	1.9×10^{10}

Tab. 01: Übersicht über die wichtigsten für PET und SPECT verwendeten Radioisotope und die zugehörigen Spezifikationen.

Dennoch wird diesen Verfahren in Zukunft einen wachsenden Anteil im Bereich der medizinisch-chemischen Forschung und Entwicklung prognostiziert, denn sie ermöglichen es, mehr Erkenntnisse über den Ablauf und damit das Verständnis von Krankheitsprozessen zu gewinnen. Das Ziel ist es eine nutzenbasierte Medikamentenentwicklung bis hin zu der Umsetzung einer auf den Patienten abgestimmten individuellen Therapie zu ermöglichen.^[54]

Für den speziellen Fall der Alzheimer Diagnostik sind bereits verschiedene Proben im klinischen Einsatz (**Abb. 12**). Sie sind wie auch Thioflavin (**12**) β -Faltblatt-Marker jedoch überwiegend unspezifisch selektiv gegenüber β -Amyloid und neurofibrillären Bündeln.^[55-60] Die für diese Marker vorwiegend verwendeten Nucleotide sind ^{18}F und ^{11}C .

Auffallend in dieser Gruppe der Alzheimer-Demenz-Marker ist, dass [^{123}I] IMPY **17** die einzige SPECT Probe ist, obwohl SPECT im Vergleich zu PET weniger aufwendig und billiger ist. Allerdings ist die Auflösung der PET durch die synchron achsial ausgesendeten Photonen deutlich höher. Bei dem Einsatz von Markern für biopathologische Strukturen wäre eine Selektivität dieser Moleküle für die verschiedenen Pathogene wünschenswert, damit zum Beispiel verschiedene Tauopathien von anderen Demenzen differenziert werden können. Außerdem wäre eine nur

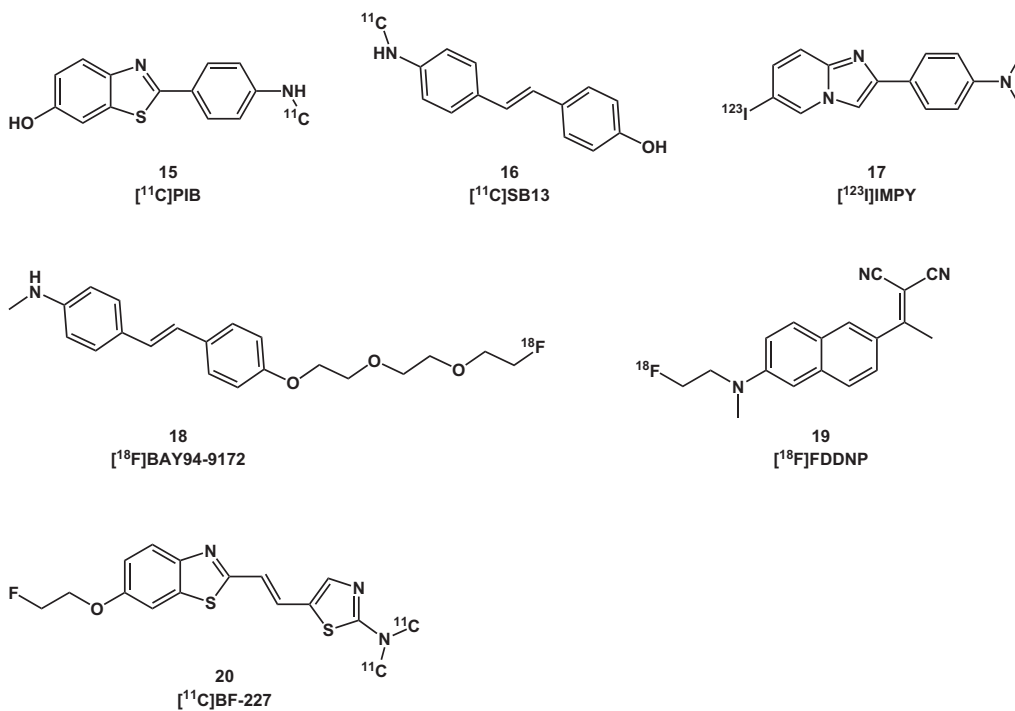


Abb. 12: Strukturen der bisher klinisch untersuchten Proben für Alzheimer die PET und SPECT Diagnostik in vivo.

Tau-Protein affine Probe, wegen des besseren Zusammenhangs vom Grad der Demenz mit der abgelagerten Menge an neurofibrillären Bündeln im Gehirn interessant.^[61] Damit ist die Neu- und Weiterentwicklung von selektiven und hochaffinen Markern für den Einsatz in der Alzheimer Diagnostik ein wichtiges Feld zur Nachverfolgung der biopathogenen Prozesse.

1.2.2 Forschung an Markern und Verfahren für die Alzheimer-Demenz

1.2.2.1 Die Forschung an weiteren möglichen Verfahren

Neben den bereits für Alzheimer-Demenz in den Kliniken angewandten bildgebenden Verfahren sind noch weitere diagnostische Verfahren denkbar, wie z.B. die Sonographie, die Fluoreszenz und die Zwei-Photonenfluoreszenz.^[51]

Die Sonographie ist ein Verfahren, das auf der Reflexion von Ultraschallwellen beruht. Besonders wasserhaltige und weiche Gewebearten haben für diese Frequenzen hervorragende Eindring- und Reflexionseigenschaften. Durch den Einsatz von Kontrastmitteln im Blutstrom und entsprechenden Pulstechniken sind sehr detailreiche Gewebeerinformationen zu erhalten. Das Gehirn ist leider nur im Säuglingsalter über die Fontanelle dieser Untersuchungsmethode zugänglich.^[62]

Die Fluoreszenz und Zwei-Photonen Fluoreszenz sind Verfahren, die auf der Emission von

Licht des sichtbaren Spektrums beruhen. Dabei kommt es bei dem adressierten Fluorophor nach einer Anregung seines energetischen Systems zu einer spontanen Emission von Strahlung geringer Energie und damit längerer Wellenlänge (Stokesverschiebung), die letztlich mikroskopisch detektiert werden kann. Dabei sind Auflösungen bis auf molekulare Ebene möglich. Die Zweiphotonenfluoreszenz ist ein Sonderfall der Anregung. Sie beruht auf der physikalischen Möglichkeit, die nötige Energie eines Photons ähnlich angeregte Zustände (Singulett/Triplett) auch über die gleichzeitige Absorption zweier Photonen mit ungefähr halber Energie zu erreichen (Abb. 13).^[63]

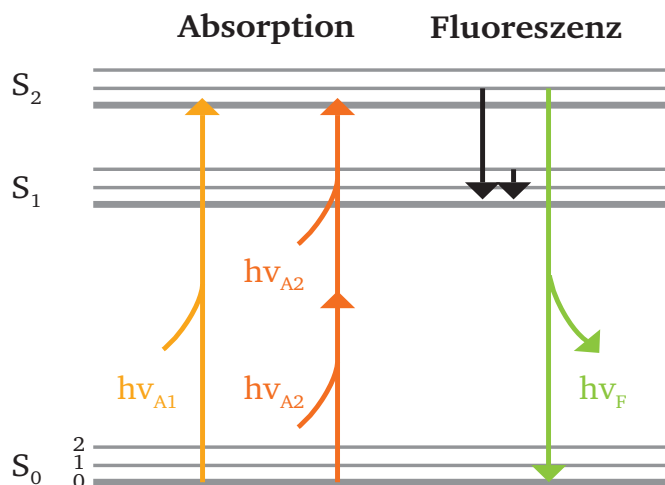


Abb. 13: Jablonski-Diagramm einzelnen Photon oder von zwei Photonen Fluoreszenzanregung.

Beiden Verfahren wird ein großes diagnostisches Potential zugeschrieben und sie sind vergleichsweise preiswert.^[64] Allerdings besteht ihr Nachteil darin, dass es sich um eine optische Methode handelt und das zu beobachtende Objekt entsprechend zugänglich sein muss. Das sollte im einfachsten Fall mit klassischen Mikroskopen erfolgen, bei denen das Objekt auf- oder untergelegt wird, aber auch über angekoppelte Faseroptiken, die endoskopisch in die Zielregion gebracht werden können. Der Vorteil bei Anregung über den Zweiphotonenmodus besteht darin, dass es möglich ist, einige hundert Mikrometer in das menschliche Gewebe einzudringen. Dies findet bisher vor allem in der Hautdiagnostik Verwendung.^[65-67]

Die Region des Hippocampus, die klassisch in der Histologie für die Alzheimer-Demenz untersucht wird, ist leider für eine *in vivo* Untersuchung nicht entsprechend mikroskopisch zugänglich. Dennoch wäre eine entsprechende nichtinvasive Fluoreszenzdiagnostik für Alzheimer Demenz attraktiv, dafür müssten allerdings entsprechende, mit der Pathologie korrelierende, Gewebe zugänglich sein. Erste Hinweise, dass eine solche Möglichkeit der Untersuchung in Betracht kommen könnte, liefert die Tatsache, dass einige Retinaabnormalitäten bei AD-Patienten bekannt sind. Dabei sind die beobachteten Merkmale meist eine Reduktion der Dicke der Nervenfaserschicht (NFL – *nerve fiber layer*). Diese Pathologie an der NFL des Auges ist auch aus anderen Krankheiten bekannt, wie beispielsweise Bluthochdruck, Glaukom, überhöhte Blutzuckerwerte, demyelinisierende optische Neuritis, Multiple Sklerose und Parkinson.^{[68] [69]} Damit ist klar, dass nur eine solche pathologische Veränderung nicht spezifisch ist, aber in ihrem Auftreten immer in Korrelation mit der jeweiligen Krankheit steht.

In den Jahren 2009 und 2010 wurden von unterschiedlichen Forschergruppen sowohl an menschlicher Retina als auch an Mäusen pathogene A β -Ablagerungen und Tau-Proteine nachgewiesen. Dabei wurden für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, Curcumin (**20**) und ein von Kongorot (**13**) abgeleiteter Farbstoff FSB ((E,E)-1-fluoro-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene) (**22**) verwendet (**Abb. 14**).^[70a,b]

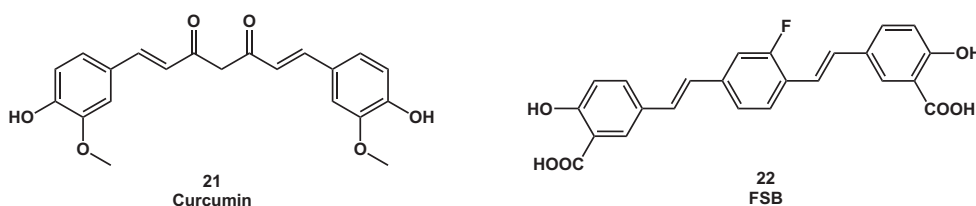


Abb. 14: Imaging Farbstoffe: Curcumin (**21**) und FSB (**22**).

Die Möglichkeit, über das Auge die mit der Alzheimer Krankheit korrelierenden pathogenen Ablagerungen zu detektieren, hätte viele Vorteile. Das Auge ist für Strahlung im sichtbaren Bereich ausgelegt und durch den Sehnerv mit dem Gehirn verbunden. Damit wäre eine Diagnose an der Retina gegenüber den derzeitigen Untersuchungsmethoden ein vergleichsweise preiswertes Verfahren und könnte damit auch in eine Vorsorgepraxis einfließen.

Die Markierung der Pathogene auf der Retina könnte durch den Glaskörper erfolgen, was deutlich einfacher wäre als durch orale Gabe, da diese nicht den Beschränkungen der Blut-Hirn-Schranke unterlägen. Weitere Erläuterungen dazu in den folgenden Kapiteln. Die wichtigsten Ziele für die Etablierung eines solchen Verfahrens wäre die Entwicklung eines entsprechenden ophthalmologischen Mikroskops in Kombination mit der Entwicklung einer entsprechenden fluoreszierenden Probe. Dies erfolgt im Rahmen eines BMBF Verbundprojektes mit der Firma Zeiss, wobei die Arbeitsgruppe Schmidt Teil dieses Forschungsverbundes „MINDe“ ist.^[71]

1.2.2.2 Die Forschung an möglichen Alzheimer-Demenz-Markern

Die bereits vorgestellten PET- und SPECT-Marker sind meist auf der Basis von Substanzscreenings bzw. durch Hinweise auf Affinitäten, wie sie von Thioflavin S (**12**) bekannt sind, entdeckt und verbessert worden.^[72] Für die Weiterentwicklung eines Markers, auch im Bezug auf das vorher geschilderte Fluoreszenzverfahren, benötigt man entsprechende Methoden.

Eine sehr wichtige Entwicklungsmethode sind dabei Tiermodelle, die repräsentativ für die jeweilige Pathologie sind. Es haben sich dabei in der Alzheimerforschung Mäuse und Zebrafische als Modellorganismen etabliert und es gibt eine Vielzahl an transgenen Tiermodellen dieser Spezies, die zum Beispiel Tau oder A β -Proteine überexprimieren.^[73] Der Zebrafisch hat dabei den zusätzlichen Vorteil, dass er bis zu einem gewissen Alter optisch transparent bleibt, was im Bezug auf Marker, die teilweise eine intrinsische Fluoreszenz aufweisen eine einfache Beobachtung erlaubt. Bei der Maus als Tiermodell ist man dazu übergegangen neben der Untersuchung im PET Scanner einen mikroskopischen Zugang ins Gehirn zu etablieren. Dafür wurde den Mäusen operativ ein Fenster in die Schädeldecke eingesetzt und mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen die jeweilige Pathologie auf der Hirnoberfläche beobachtet.^[74]

Anfänglich wurde für diese Fluoreszenzmethode das aus der Histologie bekannte Thioflavin S (**12**) verwendet. Da es aber für eine *in vivo* Applikation aufgrund seiner immanenten Ladung die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, musste es direkt auf die Hirnrinde gegeben werden. Das dafür nötige Öffnen der Schädeldecke wurde schnell von der nachhaltigeren Methode des Fenstereinbaus abgelöst.^[75] Für diese Anwendung waren andere und bessere Marker nötig. Sie sollten neben den Affinitäts- und Selektivitätskriterien, zusätzlich sehr gute Fluoreszenzeigenschaften und eine entsprechende Bioverfügbarkeit im Gehirn aufweisen, um ein wiederholtes markieren und damit eine Entwicklungsbeobachtung im lebenden Tier

möglich wurde. Deshalb entwickelte Klunk *et. al.* ausgehend von Kongorot (**13**) und Chrysamine G (**23**), von denen Fluoreszenz und Affinität an A β - und Tau-Proteine bekannt war, einen Farbstoff mit, für diese Applikation, verbesserten Eigenschaften.

Er sollte zum einen die Blut-Hirn-Schranke besser passieren und zum anderen die pathogenen A β -Plaques und neurofibrillären Bündel selektiv anfärben. Als Ergebnis wurde ein Bisstilbenfarbstoff, der in der Literatur unter der Bezeichnung Methoxy-XO4 (**24**) zu finden ist, synthetisiert (**Abb. 15**). Dieser ist nach intravenöser Gabe bereits nach 30-60 min (Dosierung 5-10mg/kg) im Mäusegehirn an den Plaques zu sehen. Die *in vitro* bestimmte Bindungsaffinität (K_i) an synthetischen Fibrillen ist mit einem K_i von 26.8 \pm 10.0 nM ähnlich wie die von Chrysamine G (**23**) mit einem K_i von 25.3 \pm 10.1 nm bei verbesserter Bioverfügbarkeit.^[74]

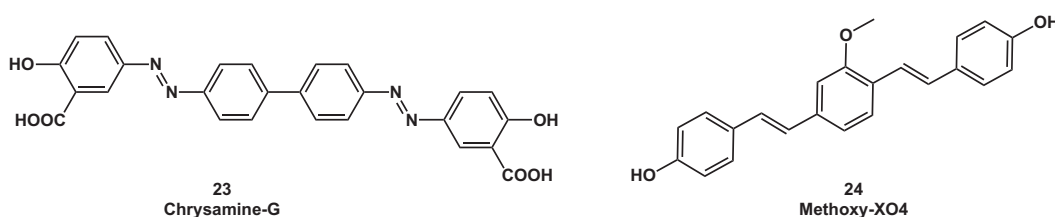


Abb. 15: Farbstoffe für die Fluoreszenz Diagnostik in Tiermodellen.

Andere Forschergruppen haben sich ebenfalls damit befasst, weitere Klassen von selektiv an A β - oder Tau-Proteine bindende fluoreszierende Farbstoffe zu identifizieren. Die Synthese dieser fluoreszierenden Proben hat meist auch das Ziel, einen PET/SPECT-Marker zu entwickeln. Die Fluoreszenz ist dabei, wie aus dem zuvor geschilderten ersichtlich, ein wichtiger Entwicklungsparameter.^[76] Die als affin identifizierten Struktur motive sind Stilbene (**25**)^[78], Quinoline (**26**)^[77], Thioflavinanalogue (2-(4-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole) (**27**) (IBOX)^[79], Benzimidazole (**28**)^[77], Curcumin (**21**)^[80] und auf deren Analoga basierende Farbstoffe (**Abb. 16**).

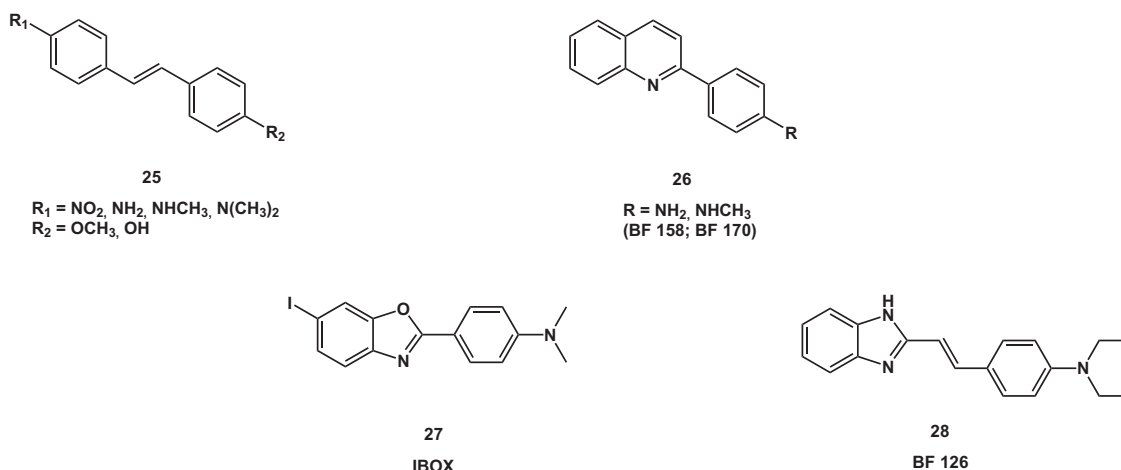


Abb. 16: Weitere Farbstoffe und Marker für A β -Plaques und NFTs.

1.2.2.3 Anforderungen an medizinisch-chemische Fluorophore

Generell sollten fluoreszierende Proben für das medizinisch-chemische Imaging bei einigen Eigenschaften wie Wellenlänge, Intensität/Helligkeit, Stabilität, Pharmakokinetik und Zellgängigkeit bestimmte Parameter erfüllen.^[81] Die Wellenlänge des Anregungslichtes und des emittierten Lichtes ist entscheidend. Liegt die Anregungsfrequenz zu weit im ultravioletten Bereich, kann dieses Gewebeschäden hervorrufen. Außerdem darf nicht zu kurzweilig bestrahlt werden, damit eine gewisse Eindringtiefe im Gewebe erreicht werden kann. Geht man mit der Anregung in den Nah-Infrarot-Bereich, kann es zu Gewebeerwärmungen mit ebenfalls schädigender Wirkung kommen.^[82] Im mittleren Bereich des sichtbaren Spektrums um 600 nm wird durch die Anwesenheit zahlreicher endogener Fluorophore eine massive Zunahme von Autofluoreszenzsignalen erhalten und damit ein negativ Einfluss auf den Kontrast. In **Abb. 17** sind die den endogenen Fluorophoren zugehörigen Absorptions- und Emissionsbanden aufgezeigt.

Daraus ergeben sich gewisse Vorgaben für die optischen Eigenschaften der Probe. Die Stokes-Verschiebung, die Differenz zwischen der Energie von ein und ausgehendem Photon, sollte aus technischer Sicht mindestens 20 nm betragen, um mit gängigen Bandpassfiltern arbeiten zu können. Zur Vermeidung starker Autofluoreszenzsignale sollte die Anregung zwischen 600-850 nm und die Emission zwischen 650-900 nm erfolgen, wobei in neueren Farbstoffen der Trend hin zu der Entwicklung von Nah-Infrarot (NIR) Farbstoffen zu gehen scheint.^[83] Diese erlauben höhere Eindringtiefen und verbessern den Kontrast. Gleichzeitig minimiert man, im Vergleich zu den im ultravioletten Bereich strahlenden Farbstoffen, mögliche cytotoxische Effekte.^[82]

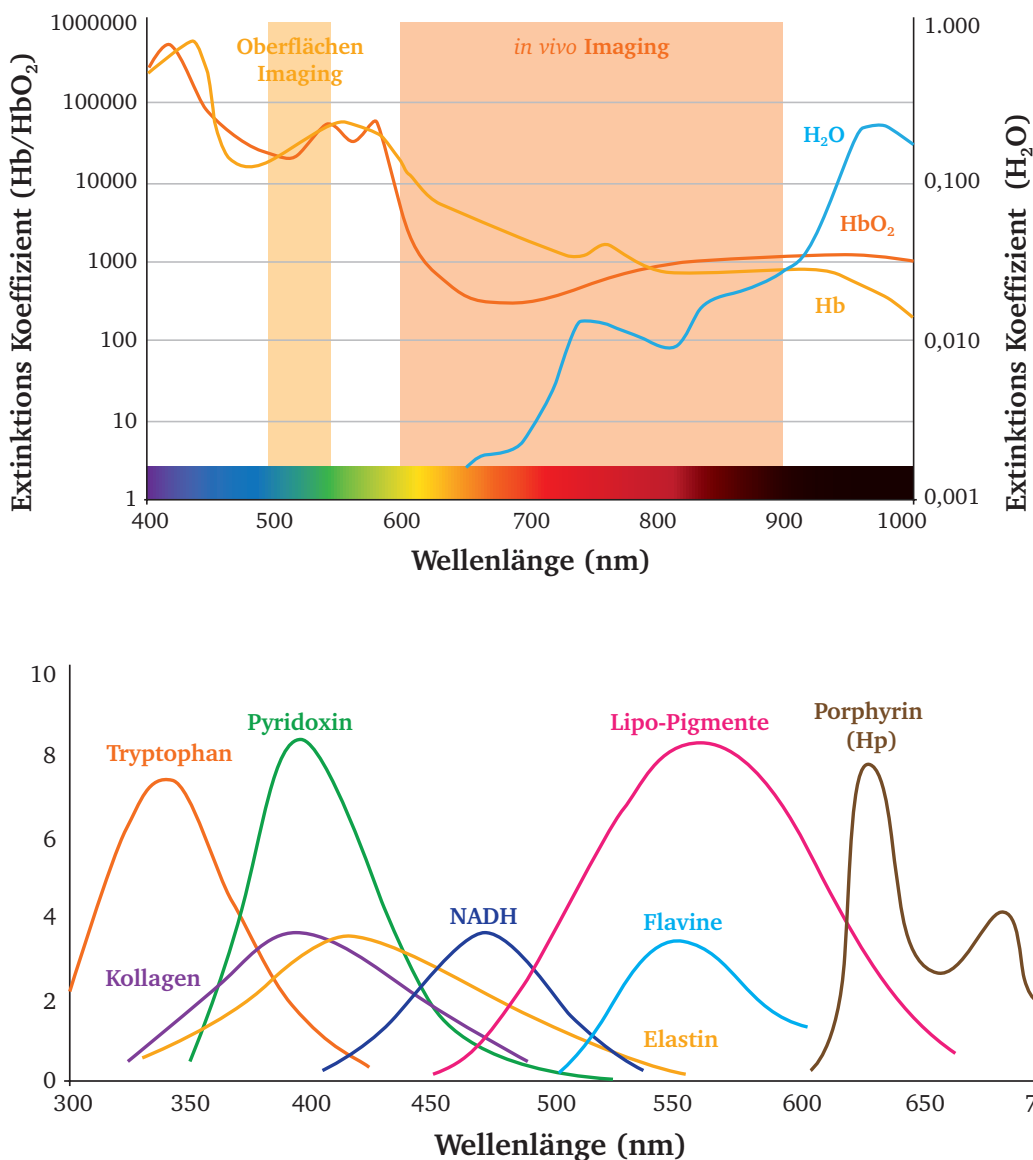


Abb. 17: Absorptions und Emissions Spektren endogener Fluorophore. Oberes Spektrum der endogenen Flüssigkeiten: Wasser (H₂O), Hämoglobin mit (HbO₂) und ohne Sauerstoff (Hb). Unteres Spektrum überwiegend Zellbestandteile; Abkürzungserklärung: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), Lipoprotein-Pigmente (Lipo-Pigmente)

Entscheidend für das Signal- zu Rauschverhältnis sind die **Intensität/Helligkeit** eines Farbstoffs sowie dessen Bindungsfähigkeit. Je besser ein Farbstoff rückstrahlt, desto mehr Informationen kann man auch aus tiefer liegenden Gewebeschichten auslesen. Der dafür wichtige Parameter ist die Quantenausbeute. Sie kann bis zu einem gewissen Grad chemisch optimiert werden, geht aber leider oft mit unerwünschten Faktoren einher. Entscheidend für hohe Quantenausbeuten ist die Molekülgröße und eine eventuelle Metallkerninvolvierung. Als klassische

Beispiele dafür sind das grün fluoreszierende Protein (GFP) und die *Quantum Dots* zu nennen, beide mit Molekülmassen > 500 g/mol und derzeit Spitzenreiter mit ihren Quantenausbeuten bei der Untersuchung biologischer Prozesse.^[84] Daraus ergeben sich wiederum Limitierungen für die Applikation *in vivo* bezüglich ihrer Galenik, Bioverfügbarkeit und Sicherheit. Zum Beispiel finden in *Quantum Dots* potentiell toxischen Bausteine wie Selen und Cadmium Verwendung, die möglichst nicht in biologischen Systemen freigesetzt werden sollten.^[85]

Für die **Galenik** ist in dem speziellen Fall der Diagnostik im und am Hirn darauf zu achten, dass die Probe die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Die Blut-Hirn-Schranke ist vereinfacht eine Zell- und Enzymbarriere, die das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Toxinen, Krankheitserregern und Botenstoffen schützt, gleichzeitig aber auch einen Stoffaustausch zulässt, um die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten zu ermöglichen.^[86] Als Orientierung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit für oral verfügbare Medikamente auf der Basis kleiner organischer Moleküle dienen die von Lipinski ermittelten Richtlinien. Sie besagen, dass die Absorptions- und Permeationseigenschaften *in vivo* gut sind, wenn:

- Nicht mehr als fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH-/NH-Gruppen) vorliegen
- Nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. O/N-Atome) vorliegen
- Die Molekülmasse nicht größer als 500 g/mol beträgt.
- Der berechnete dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten von Oktanol/Wasser (clogP) einen Wert von fünf nicht überschreitet.^[87]

Das erklärt warum sich GFP nicht für eine humane *in vivo* Diagnostik als Marker eignet.

Weiterhin ist die **Stabilität** der Probe *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* ein wichtiges Kriterium, das sich stark voneinander unterscheiden kann. Dabei spielen metabolische Prozesse eine Rolle, die sich auf die biologische Halbwertszeit und Fluoreszenz auswirken, zumal organische Fluorophore generell einem gewissen Fotobleaching unterliegen. Die **Pharmakokinetik** ist ein eng damit verknüpfter Faktor. Je nach Anwendung muss die Probe schnell am Target sein aber nach einer gewissen Zeit dort auch wieder abgebaut werden.^[81] Damit sind die wichtigsten Eigenschaften, für die Entwicklung einer fluoreszierenden Sonde, speziell für diagnostische Zwecke am Gehirn, vorgegeben und müssen auf etwaige technische Anforderungen der Detektionstechnik entsprechend abgestimmt werden.

1.3 Der Zebrafärbling als Tiermodell

In der medizinalchemischen Forschung und Entwicklung geht die Synthese von Molekülen immer mit der Bereitstellung von anschließenden Aktivitäts- und Wirkbeziehungen einher. Dies kann im günstigsten Fall eine Kristallstruktur des Targets, z. B. ein Protein mit aktiver Tasche sein, in die hinein dann mit Hilfe von Computersimulationen ein pharmakophores Modell eingepasst wird. Parallel dazu oder auch, wenn solche Computertechniken auf Grund fehlender entsprechender Information nicht anwendbar sind, werden meist Hochdurchsatz-Screenings (HTS) auf der Basis von zellulären oder auch zellfreien Assays durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt dann meist für die Bestimmung von Wirkung, Mechanismus, Toxizität und weiterer Daten die Hilfe eines Tiermodells zum Tragen.^[88] Üblicherweise werden erste Tests mit Mäusen oder Ratten durchgeführt. Weitere Studien können dann bis hin zum Affen erfolgen, bevor am Menschen getestet wird. Mit zunehmender Tiergröße wachsen Aufwand und Kosten.

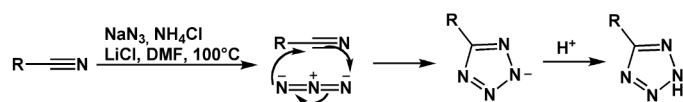
Der Zebrafärbling nimmt seit Mitte der 1970er Jahre eine Sonderstellung ein, da er im Vergleich zu anderen Tiermodellen diverse Vorteile bietet. Er ist kostengünstig zu halten und einfach zu vermehren, genetisch relativ leicht manipulierbar und hat eine sehr hohe Reproduktionsrate, was es sogar möglich macht, ihn in Hochdurchsatz-Screens zu verwenden.^[89] Er kann auf sehr geringem Raum gehalten werden und ist bis zu einem gewissen Entwicklungsstadium optisch transparent. Nach bereits 2 Tagen ist die Embryonalentwicklung soweit vorangeschritten, dass alle wirbeltierspezifischen Körpermerkmale zu sehen sind. Dies beinhaltet ein kompartimentiertes Gehirn, Augen und alle inneren Organe. Im Vergleich zu höheren Wirbeltieren sind zwar alle Organe mit weit weniger Zellen ausgebildet, aber voll funktionsfähig und mikroskopisch beobachtbar. Die Larve ist bereits 5 Tage nach dem Schlüpfen fertig entwickelt, schwimmfähig und auf Futtersuche. Die Generationenfolge ist mit 2-4 Monaten zwar vergleichsweise lang, aber die genetisch durchführbaren Manipulationen sind vielfältig.^[90] In der AD-Forschung hat sich der Zebrafärbling, sowohl in der Erforschung der Ursachen als auch in der Entwicklung von Medikamenten bewährt.^{[91] [92]} Ebenso findet der Zebrafärbling Verwendung bei der Untersuchung von Toxikologie^[93] und Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit.^[94] Im Hinblick auf die Entwicklung von Farbstoffen ist er ein einfaches Modell für die Bestimmung von Permeations- und Toxikologiedaten.

1.4 Synthese Methoden: Terazolsynthesen

Die Ausnutzung von Bioisosterie ist in der Medizinalchemie ein wichtiges Prinzip, um Eigenschaften physikalischer und chemischer Natur, z. B. pK_s -Wert, Planarität und Lipophilie zu variieren. Im Falle der 5-substituierten Tetrazole ist das Tetrazoyl ein Bioisoster der Carboxylgruppe. Beide funktionellen Einheiten haben gleiche pK_s -Werte und liegen als planare Anionen vor. Die Anionen der Tetrazole sind allerdings deutlich lipophiler. Dies kann beim Transport durch die Zellmembran eine entscheidende Rolle spielen. Auch hat die deutlich größere molekulare Oberfläche des Fünfrings und die damit verbundene größere Ladungsverteilung Einfluss auf etwaige Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen.^[95]

In der Bluthochdrucktherapie finden sich zum Beispiel in der Klasse der auf dem Markt befindlichen Sartane, das sind synthetische AT_1 -Rezeptorantagonisten, dieses Strukturmotiv mit verbesserten Aktivitäten. Die technische Produktion dieser Tetrazolderivate ist mit gewissen Risiken verbunden. In der großtechnischen Synthese wird ausgehend von einer Nitrilfunktionalität mit Natriumazid und Alkylstannylan in THF, Toluol, 1,4-Dioxan oder Xylol umgesetzt. Dabei entstehen *in situ* äquimolare Mengen an Alkylstannylaziden, welche sich allerdings meist nur sehr schlecht in organischen Lösungsmitteln lösen. Das Problematische an diesem Verfahren ist die Giftigkeit der anfallenden zinnhaltigen Abfälle und deren kostenintensive Entsorgung. Während der Reaktion entsteht die giftige, explosive und flüchtige Stickstoffwasserstoffsäure. Sie hat die unangenehme Eigenschaft, in Teilen der Apparatur zu kondensieren, so dass die Reinigung nach der Synthese mit besonderer Vorsicht durchzuführen ist.

Neben der oben beschriebenen Methode gibt es die Möglichkeit der direkten Umsetzung mit Stickstoffwasserstoffsäure. Lofquist *et. al.* entwickelte eine Methode, bei der man die Stickstoffwasserstoffsäure *in situ* aus Ammoniumchlorid und Natriumazid erzeugt (**Schema 02**).^[96] Sharpless *et. al.* verwendete Natriumazid und Zinkbromid.^[97] Der Vorteil dieser Lewisäure ist, dass die Synthese in Wasser durchgeführt werden kann. Der Nachteil sind die meist schlechteren Ausbeuten, aufgrund der verschlechterten Löslichkeit der Substrate in Wasser.



Schema 02: Synthese eines Tetrazols nach Lofquist *et.al.*.^[96]

Eine weitere Methode wurde von Amantini *et. al.* entwickelt und nutzt gleichzeitig Trimethylsilylazid als Azid-Quelle und Lösungsmittel. Im Hinblick auf eine großtechnische Anwendung in der Pharmaproduktion sind aber solche lösungsmittelfreie Reaktionsbedingungen wegen der erschwerten Kontrolle des Temperaturgradienten nicht praktikabel.^[98] Der Einsatz anderer Lösungsmittel und Verfahrenvarianten ist dementsprechend auch mit Hinblick auf alternative sicherere großtechnische Anwendungen ein interessantes Aufgabenfeld.

2. Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den Eingangs geschilderten Sachverhalten im Hinblick auf Therapie und Diagnostik der Alzheimer-Demenz wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Teilaspekte untersucht und bearbeitet:

- Es wurden γ -Sekretase Modulatoren auf der Basis des Carbazolgrundgerüsts synthetisiert. Die vorgenommenen chemischen Variationen und deren Einfluss auf die Aktivität sollten auch Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus geben; der Schwerpunkt lag hier auf der Synthese von Säureisosteren. Dabei wurden auch Untersuchungen zu der Synthese von Tetrazolen speziell in ionischen Flüssigkeiten und deren Anwendung gemacht.
- Es wurden Untersuchungen zur Evaluation verschiedener Farbstoffklassen in Bezug auf ihre Tauglichkeit für Alzheimer-Demenz Markierung durchgeführt. Dies untergliederte sich in verschiedene Aufgabenfelder:
 - Die Synthese von neuen selektiven und aktiven fluoreszierenden Farbstoffen für den zukünftigen Einsatz in der Diagnostik von AD.
 - Die histologische Evaluation verschiedener Farbstoffklassen.
 - Die Beschäftigung mit weiteren für das Imaging relevanten Zielorganen und Geweben und der zugehörige Markierung.
 - Der Aufbau und die Etablierung eines Zebrafisch basierten Toxizitäts-, Biodistributions-, Inhibitorentest Assays für die Weiterentwicklung von fluoreszierenden Sonden und Sekretaseinhibitoren.

3. Allgemeiner und kumulativer Teil

In den folgenden Kapiteln werden die Versuche und deren Ergebnisse beschrieben, die im Rahmen dieser Dissertation in verschiedenen Projekten bearbeitet wurden.

3.1 Entwicklung spezieller Synthesemethoden: Tetrazolsynthesen

Die in der Einleitung beschriebenen Problematiken und Risiken bei der Tetrazolsynthese erfordern Entwicklungen, die diese Reaktion in ihrer Handhabung sicherer machen. Speziell hinsichtlich der Entstehung flüchtiger Stickstoffwasserstoffsäuren und der Löslichkeit der eingesetzten Azide im Reaktionsmedium. Dabei sollten ionische Flüssigkeiten zum Einsatz kommen, die durch ihre besonderen Eigenschaften durchaus geeignet schienen.^[98]

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Autoren: B. Schmidt, D. Meid, D. Kieser.

Titel: „*Safe and fast tetrazole formation in ionic liquids*“.

Journal: Tetrahedron **2007**, 63, 492-496.

Zusammenfassung:

Die [2+3]-Cycloaddition von Nitrilen und Aziden ist eine verlässlich verlaufende intermolekulare Reaktion, jedoch ist die Gefährdung, die von den bei der Reaktion entstehenden flüchtigen, explosiven und giftigen Stickstoffwasserstoffsäuren ausgeht, erheblich. Die Zink-katalysierte, in wässriger Lösung durchgeführte Variante der Reaktion ist eine deutliche Verbesserung, aber erfordert anschließend eine Abtrennung der Zinksalze vom Produkt. Im Folgenden beschreiben wir eine sichere Synthesemethode mit Hilfe ionischer Flüssigkeiten. Die ionischen Flüssigkeiten auf Basis von alkylierten Methylimidazolen haben zum einen einen sehr niedrigen Dampfdruck und weisen zum anderen sehr gute Löslichkeitseigenschaften der Azide auf. Es kann somit in ionischen Flüssigkeiten auf Basis dieser alkylierten Methylimidazolen kombiniert mit Mikrowellenerwärmung in guten bis sehr guten Ausbeuten eine Tetrazolsynthese ohne die Nachteile problematischer Zinksalze oder flüchtiger Stickstoffwasserstoffsäuren, durchgeführt werden. Die in vorliegender Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen:

3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27

Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Ltd. All rights reserved.

Safe and fast tetrazole formation in ionic liquids

Boris Schmidt,* Daniela Meid and Daniel Kieser

Clemens Schöpf-Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Darmstadt Technical University, Petersenstr. 22,
D-64287 Darmstadt, Germany

Received 17 May 2006; revised 18 October 2006; accepted 19 October 2006

Available online 13 November 2006

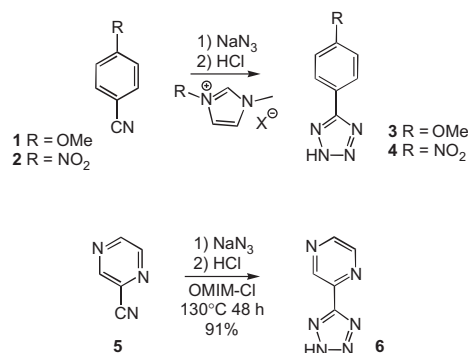
Abstract—The [2+3] cycloaddition of nitriles and azides is reliable for intramolecular reactions, but the hazards with volatile azides in intermolecular reactions are tremendous. Zinc catalysis in aqueous solution is a magnificent improvement, but requires the removal of the zinc salts from the acidic product. Herein, we report safe solvents featuring low vapor pressure and good solubility of NaN_3 . Ionic liquids based on alkylated imidazoles combined with microwave heating turned out to be a solution for the given tasks.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1*H*- and 2*H*-Tetrazoles are regarded as isosteric replacements¹ of carboxylic acids with improved properties in drug metabolism and pharmacokinetics. Thus, they are frequently employed in the lead optimization of ethical drug candidates to enhance the oral bioavailability. Several successful examples of this strategy are present in the sartane drug family, which is used to treat hypertension.^{2,3} The [2+3] cycloaddition of nitriles and azides is a reliable method for intramolecular cases, but volatile azides create tremendous hazards in intermolecular reactions. Large-scale processes solve some of the safety issues by using non-volatile tin azides, but introduce the problem of tin recovery.^{4,5} The ‘click’ chemistry approach utilizing⁶ zinc catalysis in aqueous solution is a magnificent improvement over previous methods, but sometimes still requires the tedious removal of zinc salts from the acidic products. Moreover, the reaction rates at 100 °C are often insufficient for bulk intermediates. The economic ‘click’ processes in water require higher temperatures and pressurized vessels. The classical approach utilizes sodium azide and trialkylamines in refluxing toluene, but is limited to the laboratory scale because of volatile ammonium azides, which are prone to sublimation. Furthermore, toluene is not a good solvent for NaN_3 , which results in slow turnover, azide deposits and has thus to be regarded as an unsafe, poor alternative. The solvent free conversion by tetrabutylammonium fluoride and trimethyl azide⁷ is very attractive for small-scale experiments, but the exothermic azide formation will be hard to control in upscaled reactions.⁸ We set out to investigate safer solvents featuring a low vapor pressure and good solubility of NaN_3 and

compared them to the methods published by Amantini,⁷ Sharpless⁶ and Hallberg.⁹ Commercial ionic liquids^{10,11} (IL) based on alkylated imidazoles turned out to be a versatile solution for the given tasks. Two nitriles (**1** and **2**, Scheme 1) were selected to explore the influence of the methylimidazolium substituents: methyl, butyl, hexyl and octyl. It turned out that these substituents have only minor impact on the outcome of the reaction (Table 1, entries 6–8)¹² in comparison to the contribution of the acid/azide ratio. But there is hidden value in these alkyl chains. The more lipophilic hexyl and octyl imidazoles are less miscible with water and allow easier aqueous extraction of the products, which simplifies the product isolation and improves the isolated yields. The counter anion of the ionic liquids was varied from: Cl^- , Br^- , PF_6^- , SO_3CF_3^- to $\text{PF}_6^-(\text{C}_2\text{F}_5)_3$ and have a higher impact. There was no general trend observed for the two halides, but the halides are far better than triflate or the perfluorinated phosphate (Table 1, entries 28 and 29). The ionic liquids



Scheme 1. Tetrazole formation from commercial nitriles.

* Corresponding author. Tel.: +49 6151 163075; fax: +49 6151 163278;
e-mail: schmidt_boris@t-online.de

Table 1. Tetrazole formation in different ionic liquids at varying temperatures and stoichiometric ratios

Entry	Substrate or product	NaN ₃ (equiv)	HOAc (equiv)	Ionic liquid	T/time	Turnover (%)	Yield (%)
1	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[BMIM]Br	70 °C/38 h	62	17
2	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[BMIM]Cl	70 °C/38 h	28	43
3	4-Methoxybenzonitrile (1)	2.2	1.5	[HMIM]Cl	70 °C/38 h	87	56
4	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[OMIM]Cl	70 °C/38 h	79	76
5	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[BMIM]Br	170 °C/24 h	98	94
6	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[BMIM]Cl	170 °C/24 h	89	82
7	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[HMIM]Cl	170 °C/24 h	95	91
8	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	1.5	[OMIM]Cl	170 °C/24 h	97	94
9	4-Methoxybenzonitrile (1)	1.1	0.7	[OMIM]Cl	170 °C/24 h	98	98
10	4-Nitrobenzonitrile (2)	1.1	1.5	[BMIM]Br	70 °C/72 h	97	91
11	4-Nitrobenzonitrile (2)	1.1	1.5	[MMIM]Cl	70 °C/72 h	94	89
12	4-Nitrobenzonitrile (2)	1.1	1.5	[HMIM]Cl	70 °C/72 h	72	60
13	4-Nitrobenzonitrile (2)	1.1	1.5	[OMIM]Cl	70 °C/72 h	97	89
14	2-Pyrazylcarbonitrile (5)	2	0.5	[OMIM]Cl	130 °C/48 h	>95	91
15	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	2	0.5	[MMIM]Cl	140 °C/48 h	93	78
16	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	1.1	1.5	[BMIM]Br	170 °C/48 h	70	12
17	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	1.1	1.5	[BMIM]Cl	170 °C/48 h	62	1
18	4'-methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	1.1	1.5	[HMIM]Cl	170 °C/48 h	71	35
19	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7) (10 mmol)	1.1	1.5	[OMIM]Cl	170 °C/48 h	>95	71
20	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	2	0.5	[OMIM]Cl	170 °C/24 h	100	59
21	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	3	0.7	[BMIM]Cl	200 W/1 h	85	80
22	4'-Methyl-2-biphenylcarbonitrile (7)	2	0.2	[OMIM]Cl	170 °C/24 h	44	18
23	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[BMIM]Cl	140 °C/8 h	66	57
24	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[BMIM]Cl	140 °C/15 h	91	77
25	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[BMIM]Cl	140 °C/24 h	100	73
26	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[BMIM]Br	140 °C/24 h	100	48
27	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[HMIM]Cl	140 °C/24 h	85	73
28	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[BMIM]SO ₃ CF ₃	140 °C/24 h	26	6
29	8 (0.75 mmol)	3	0.7	[HMIM]PF ₃ (C ₂ F ₅) ₃	140 °C/24 h	0	0
30	9	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	100	89 ^a
31	7	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	58	40 ^a
32	10	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	100	97 ^a
33	5	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	90	77 ^a
34	11	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	n.d.	26 ^a
35	8	3	1	[BMIM]Cl	170/0.5 h, mw	100	88 ^a

[BMIM]: 1-butyl-3-methylimidazolium, [MMIM]: 1-methyl-3-methylimidazolium, [HMIM]: 1-hexyl-3-methylimidazolium, [OMIM]: 1-octyl-3-methylimidazolium. Conc: 0.5 M sample size 1 mL, if not noted otherwise. The turnover was controlled against internal standard, the optimized yields are isolated yields, mw=Biotage® Initiator™ microwave.

^a Crude yields determined by HPLC.

based on *N*-sulfonamide anions display sufficient vapor pressure to allow distillation.¹³ Thus, they were excluded from our investigation.

Initially, the temperature range had to be optimized to guarantee complete conversion within 24 h. This was achieved at 70 °C with electron deficient substrates such as **2**, which is known to react readily during azide formation.^{6,8} The less electron deficient pyrazine-2-carbonitrile **5** demanded a higher temperature (130 °C) and extended reaction time of 48 h. The electron rich substrates such as **1** and **8** required even higher reaction temperatures of 170 and 140 °C, respectively. Extended reaction time or higher reaction temperatures resulted in decreased yields for all tetrazoles. This was due to both product and solvent decompositions. A crucial role was assigned to the amount of acetic acid added. Large excess of HOAc versus NaN₃ drove the volatile HN₃ out of the reaction mixtures and thus created a safety issue. Equimolar or substoichiometric amount of acetic acid in relation to sodium azide provided good yields, sufficient reaction rates and economic utilization of NaN₃.

The experiments summarized in Figure 1 provided the standard procedure (140 °C, 0.5 mmol, 24 h in a screw capped 1 mL vial, 3 equiv NaN₃, 1 equiv acid in 100 mg IL) in IL

for comparison against the established methods from Amantini and Sharpless.^{6,7} All compounds were isolated after aqueous work up, extraction by ethyl acetate or precipitation, where appropriate. The synthesis in IL turned out to be superior in isolated yield for 13 out of 20 products. Amantini method provided the other seven products, e.g., **9** and **23** (Fig. 1), in better yields. However, this method requires a hazardous combination of reagents. The Sharpless method was sometimes even, but generally lacked in isolated yield. The difficulty in isolation of water soluble products (clog *P* < 1) was a major cause for the poor yields of the compounds **11**, **24–26** (Fig. 1 and Scheme 2). We selected two advanced intermediates (**7+8**, Scheme 3) from the synthesis of sartane drugs^{2,3} to explore the applicability to functionalized substrates. The commercial biphenylnitrile **7** required an elevated reaction temperature and careful optimization of the stoichiometry to result in **14** with a yield of 78%. However, the necessary reaction time was rather long, which resulted in significant byproduct formation, mainly through product decomposition. However, the tetrazole formation can be accelerated by microwave heating of DMF solutions.⁹ The desired rapid heating was reported for [BMIM]PF₆. The standard alkyl-[MIM] based ionic liquids do not feature dipole moments suitable for rapid microwave heating, thus the energy absorption is due to ionic conductivity.^{14,15}

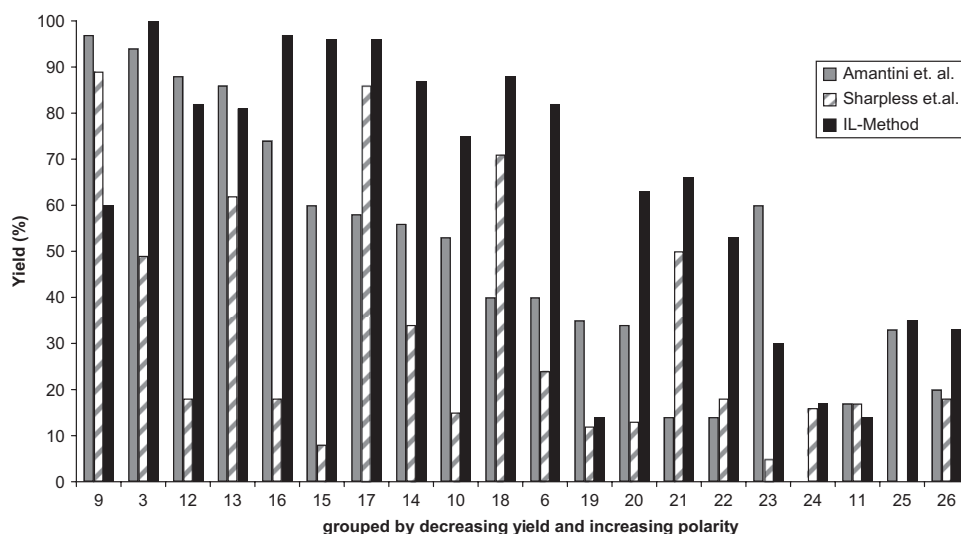
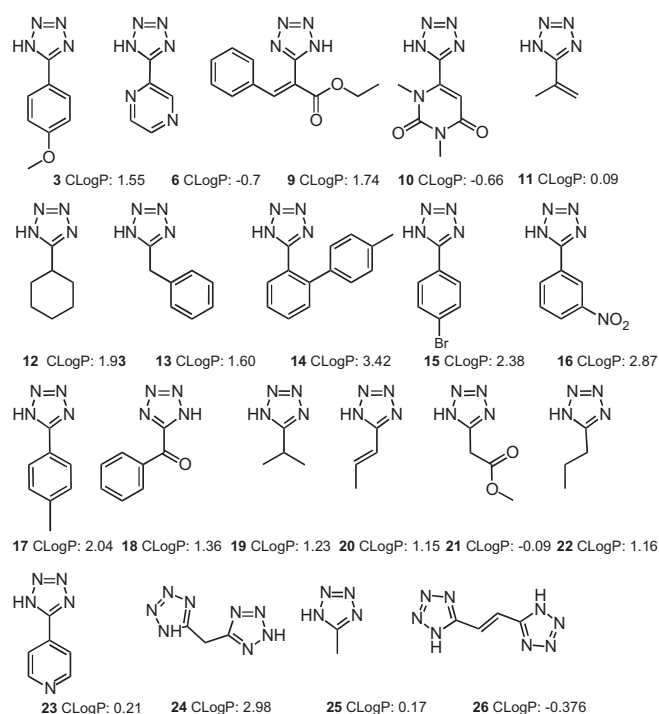


Figure 1. Comparative tetrazole synthesis (Scheme 2 for structure). IL-method: 140 °C, 24 h.

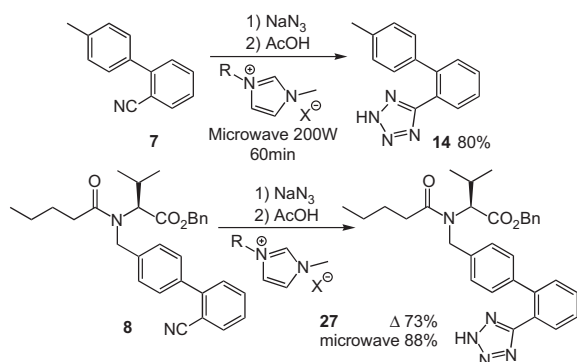
Therefore, we investigated the heat rate of the selected pure IL in comparison to pure DMF under otherwise identical conditions to select suitable candidates. Up to 250 W of microwave irradiation was required to achieve a similar temperature profile as for DMF (Fig. 2).⁹ The depicted [BMIM]Cl displayed an induction phase for the energy absorption and ionic conductivity, which increased significantly above 60 °C. Thus, it is due to the melting and the onset of ionic conductivity. A similar effect was observed for [BMIM]Br and [HMIM]Cl. Preliminary investigations of the three ILs by differential scanning calorimetry did

not reveal any phase transitions or decomposition between –100 and 200 °C, except for the melting points of [BMIM]Cl at 41 °C (Fig. 3) and [BMIM]Br at 77 °C. The ILs were stable for one heat cycle as judged by ¹H NMR spectroscopic analysis. However, repeated heating (3×) resulted in partial decomposition (15%) as judged by ¹H NMR spectroscopy. This thermal decomposition has been reported previously.^{16,17}

Regardless of the IL decomposition, the reaction time was dramatically shortened using microwave heating at 200 W



Scheme 2. Tetrazole formation from commercial nitriles.



Scheme 3. Synthesis of advanced sartane intermediates.

setting in a burst sealed reaction vessel (entry 21). No attempts were initially made to control the temperature at the small scale of the reaction (0.75 mmol) in a household microwave oven. The microwave heated reaction was complete within 60 min and far more selective (compare entries 15–22). It furnished the product in 80% yield. The more detailed investigation was conducted in a Biotage Initiator™, which allowed to monitor the pressure and temperature over time. The ILs were screened for rapid heating, which in some cases varied significantly due to water impurities. Several ILs displayed the desired rapid heating and were,

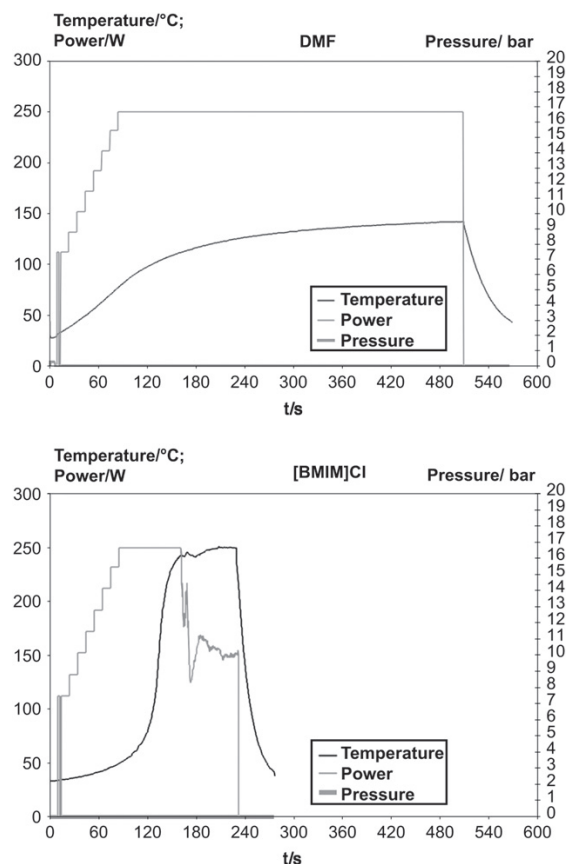


Figure 2. Rates of DMF and [BMIM]Cl microwave heating.

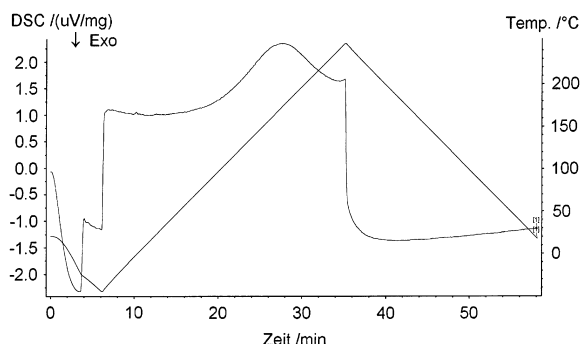


Figure 3. Differential scanning calorimetry of [BMIM]Cl.

therefore, selected for further evaluation. The [BMIM]Cl turned out to be superior again, mainly due to rapid conversion and product purity (Table 1, entries 30–35). Six representative compounds were submitted to a standard protocol: 170 °C for 30 min, 0.5 mmol nitrile, 1.5 mmol NaN₃, 0.5 mmol HOAc. This protocol is similar in reaction time to the Hallberg⁹ conditions, but uses a temperature maximum instead of a fixed power input to reduce product decomposition. The yields were superior in five cases, when compared to thermal heating of IL solutions. The yield improvements are less spectacular than reported for microwave heating of DMF solutions.⁹ Product **7** (Table 1, entry 31) requires extended reaction time for full conversion, therefore an inadequate 40% yield was observed under these suboptimal conditions.

Finally, the valsartan precursor **8** was synthesized according to literature^{4,5} and subjected to tetrazole formation. The adjustment of the NaN₃/HOAc ratio and a gentle thermal heating at 140 °C provided the product in 73% yield at complete conversion (Table 1, entries 23–29). Any extension of the reaction time resulted in slow decomposition of the tetrazole **27**. The microwave heated conversion of this important commercial intermediate **8** resulted in significant improvement of the isolated yield (88%, Table 1, entry 35) and much reduced reaction time (24 h vs 30 min). The upscaling of the reaction, improved the work up procedures such as extraction by CO₂sc and stability of the IL are subject to further investigations.

Acknowledgements

We thank the Fonds der Chemischen Industrie and Dr. U. Welz-Biermann, Merck KGaA, Germany, for support of this work. We thank B. Albert and H. Wolf, TU Darmstadt, for differential scanning calorimetry.

References and notes

- Herr, R. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3379–3393.
- Wexler, R. R.; Greenlee, W. J.; Irvin, J. D.; Goldberg, M. R.; Prendergast, K.; Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. *M. J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 625–656.
- Schmidt, B.; Schieffer, B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2261–2270; Schmidt, B.; Drexler, H.; Schieffer, B. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2004**, *4*, 361–368.

4. Bühlmayer, P. Preparation of *N*-aryl amino acid carboxyalkyl ester derivatives as angiotensin II antagonists. PCT Int. Appl. WO9730036, 1997; pp 36; Novartis A.-G., Switz.
5. Bühlmayer, P.; Ostermayer, F.; Schmidlin, T. Preparation of [(tetrazolylbiphenyl)methyl]amines and analogs as angiotensin II antagonists. Eur. Pat. Appl. EP 443983, 1991; pp 64; Ciba-Geigy A.-G., Switz.
6. Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7945–7950.
7. Amantini, D.; Beleggia, R.; Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Vaccaro, L. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2896–2898.
8. Butler, R. N. *Compr. Heterocycl. Chem. II* **1996**, *4*, 621–678; *Compr. Heterocycl. Chem. II* **1996**, *4*, 905–1006.
9. Alterman, M.; Hallberg, A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7984–7989.
10. Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3772–3789; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3926–3945.
11. Welton, T. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2071–2084.
12. All tetrazoles mentioned in this publication were independently synthesized by published methods to guarantee the identity of the products isolated from reactions run in ionic liquids. The isolated products were controlled for identity by co-injected HPLC and NMR analyses. The reactions were monitored by HPLC against internal standard.
13. Earle, M. J.; Esperanca, J. M. S. S.; Gilea, M. A.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R.; Widegren, J. A. *Nature* **2006**, *439*, 831–834.
14. Vallin, K. S. A.; Emilsson, P.; Larhed, M.; Hallberg, A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6243–6246.
15. Hoffmann, J.; Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Wasserscheid, P. *Green Chem.* **2003**, *5*, 296–299.
16. Ngo, H. L.; LeCompte, K.; Hargens, L.; McEwen, A. B. *Thermochim. Acta* **2000**, *357–358*, 97–102.
17. Chan, B. K. M.; Chang, N.-H.; Grimmett, M. R. *Aust. J. Chem.* **1977**, *30*, 2005–2013.

3.2 Untersuchung der Bindungstasche von NSAID-abgeleiteten γ -Sekretase-Modulatoren durch Derivatisierung der Seitenkette und Austausch der Carbonsäurefunktion durch Säureisostere.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde März 2011 bei J. Med. Chem. zur Veröffentlichung eingereicht.

Autoren: Nicole Höttecke, Andrea Zall, Daniel Kieser, Eva Naumann, Katrin Schneider, Dirk Steinbacher, Robert Schubanel, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt.

Titel: “NSAID-derived γ -secretase modulators: Part IV: The isosteric replacement of a carboxylic acid on a carbazole scaffold”.

Zusammenfassung:

Die Modulation der γ -Sekretase hat Potential für die Behandlung der Alzheimer Krankheit. Die Mehrzahl der von NSAIDs abgeleiteten γ -Sekretase-Modulatoren tragen als gemeinsames Strukturmerkmal eine Carbonsäure. Diese beeinflussen wahrscheinlich die Permeation der Verbindung durch die Blut Hirnschranke. Aus diesem Grund wurde eine Struktur-Aktivitäts-Analyse von 33 Carbazol-Derivaten mit verschiedenen Säureisosteren oder metabolischen Säurevorläufern in einem zellulären Amyloid-Abscheidungs-Assay untersucht. Die gefundenen Aktivitäten waren entweder verbunden mit der Acidität des Carbonsäureisosteres oder der Fähigkeit einer metabolischen Aktivierung.

Die im Rahmen dieser Arbeit projektbezogen hergestellten Verbindungen:

BSc3891, BSc3892, BSc4019, BSc4122, BSc4123, BSc4124

NSAID-derived γ -secretase modulators; Part IV:

Isosteric replacements of a carboxylic acid on a carbazole scaffold

Nicole Höttecke^{#a} & Andrea Zall^{#a}, Daniel Kieser^a, Eva C. Naumann^a, Katrin Schneider^a, Dirk T. Steinbacher^a, Robert Schubel^b, Stefan Masur^b, Karlheinz Baumann^b, Boris Schmidt.^{a}*

^aClemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt,
Petersenstr. 22, D-64287 Darmstadt, Germany.

^bF. Hoffmann-La Roche Ltd., Pharmaceuticals Division, Preclinical Research CNS, Bldg. 70/345,
CH-4070 Basel, Switzerland.

[#] These authors contributed equally to this work

E-mail: schmidt_boris@t-online.de

**RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required
according to the journal that you are submitting your paper to)**

[*] Prof. Dr. Boris Schmidt

Tel: (+49) 6151-163075

Fax: (+49) 6151-163278

E-Mail: schmidt_boris@t-online.de

Abbreviations: NSAID, non-steroidal anti inflammatory drugs; AD, Alzheimer's disease; A β , amyloid- β -peptides; APP, amyloid precursor protein; Nct, Nicastrin; Aph, anterior-pharynx defective-1; Pen, presenilin enhancer; PS, presenilin, TMD, transmembrane domain; RIP, regulated intramembrane proteolysis; sGSM, substrate targeting γ -secretase modulator, BBB, blood brain barrier

ABSTRACT: Modulation of γ -secretase activity holds potential for the treatment of Alzheimer's disease. Most NSAID-derived γ -secretase modulators feature a carboxylic acid, which may impair blood brain barrier permeation. Therefore the structure activity relationship of 33 carbazoles featuring diverse carboxylic acid isosteres or metabolic precursors therefore was established in a cellular amyloid secretion assay. The activity was linked to either the acidity of the carboxylic acid isostere or the ability to undergo metabolic activation.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, γ -secretase modulation, carboxylic acid isosteres, Carprofen.

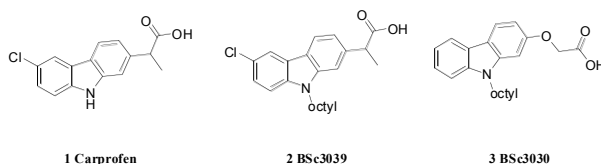
Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease, it is a devastating illness effecting more than 20 million patients globally. The brain atrophy associated with AD is accompanied by the hallmark amyloid plaques and fibrillary tangles. The plaques consist of aggregated oligomeric amyloid- β -peptides ($A\beta$) of various lengths wherein $A\beta_{42}$ is more prone to aggregate than $A\beta_{40}$ or $A\beta_{38}$.¹ These $A\beta$ -peptides are generated by sequential processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase. The γ -secretase catalyses the critical step in the liberation of these $A\beta$ isoforms, and is thus a promising target in the prevention of AD. The membrane located γ -secretase-complex consists of four proteins: Nicastrin (Nct), anterior-pharynx defective-1 (Aph-1), presenilin enhancer (Pen-2) and presenilin (PS1 or PS2).² PS1 is a 9 transmembrane domain (TMD) protein which bears two catalytic aspartates Asp²⁵⁷ and Asp³⁸⁵ in the transmembrane domains 6 and 7.³⁻⁵ These catalytic domains cleave APP within the membrane, implicating an unusual regulated intramembrane proteolysis (RIP) in the lipophilic membrane.⁶⁻⁸

Several inhibitors for this process have been reported recently.⁷ However, most of these inhibit the cleavage of other γ -secretase substrates such as Notch, which is responsible for cell proliferation. Some NSAIDs (non-steroidal anti inflammatory drugs) show a partial inhibition, the so called modulation of the γ -secretase cleavage, which is characterised by increased $A\beta_{38}$ secretion and

indicate a binding site for NSAID-derived γ -secretase modulators directly on the substrate APP close to the GxxxG region,¹⁰⁻¹¹ which is responsible for substrate dimerization and may control the processing by γ -secretase. We suggested an interaction of the NSAID's carboxylic acid with a basic amino acid, perhaps lysine⁶²⁴, on APP, which is located in the vicinity of the GxxxG motif, at the membrane interface.¹²

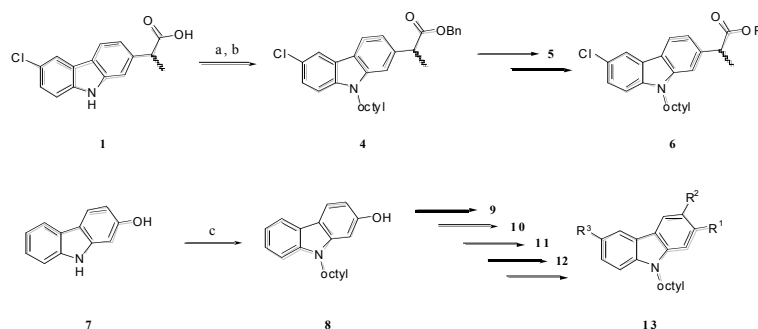
We recently reported on *N*-alkylated carprofen-derivatives with lipophilic side chains and *N*-sulfonylated or *N*-alkylated carbazolyloxyacetic acids to be substrate targeting γ -secretase modulators (sGSMs).¹³⁻¹⁴ The *N*-alkyl chain strongly enhances the modulator activity; this may be partially due to modulator orientation via a membrane anchoring effect (Scheme 1).

Scheme 1. Carprofen (**1**)⁹ is the sGSM-lead structure of **2** and **3**.¹⁴



Herein we report the replacement of the carboxylic acid of sGSMs **2** (IC_{50} ($A\beta_{38}$) = not determined, IC_{50} ($A\beta_{40}$) > 40 μ M, IC_{50} ($A\beta_{42}$) = 6.9 μ M) and **3** (EC_{50} ($A\beta_{38}$) = 24 μ M, IC_{50} ($A\beta_{40}$) > 40 μ M, IC_{50} ($A\beta_{42}$) = 19 μ M) by several carboxylic acid isosteres. This replacement aimed to reduce the topological polar surface area and the amphiphilicity of the lipophilic acids. This was expected to improve potential blood brain barrier (BBB) permeation.¹³⁻¹⁴ Carboxylic acid isosteres require related chemical environments as the carboxylic acid for target binding and thus some of them were expected to display γ -secretase modulatory effects. We chose several well established carboxylic acid isosteres such as tetrazole, sulfonic acid, sulfone amides and tetronates, alcohols or amino functionalities to obtain either straight or inverse γ -secretase modulators. In addition, we explored the available space at the modulator binding site by the introduction of sterically demanding groups. The synthesis was carried out according to scheme 2 (explicit synthesis: see experimental and supporting information).

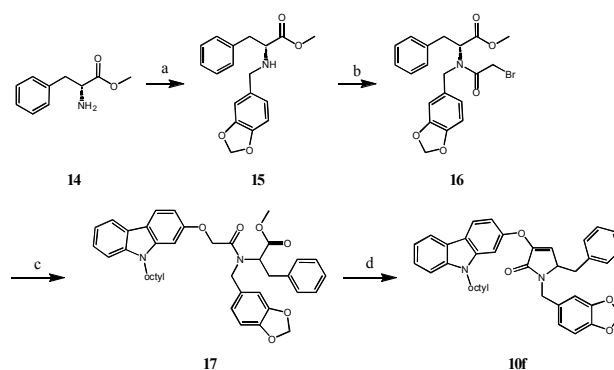
Scheme 2.^a General synthesis of carboxylic isosteres on a carbazole backbone.



^aReagents: (a) benzylbromide, K₂CO₃, acetone, rt; (b) octylbromide, NaH, THF, 0°C-rt; (c) octylbromide, NaH, THF, 0°C-rt.

We kept the length of the supposed lipid anchor at 8 carbon atoms, making a compromise between lipophilicity and activity although this anchor is not the most active sGSM. The side chain of **3** (BSc3030) bears a methylene group which is an important structural feature as an additional methylene group diminished activity. This effect was observed for the carboxylic acid **10a** and to a lesser extent for the sulfonic acid **10b**. Surprisingly, the dimethylation (**11a**) of the unsubstituted methylene diminished activity although moderately potent γ -secretase activity modulating fenofibrate-derivatives have been described.¹² However, the replacement by a salicylic acid (**10c**) displayed an A β_{42} level reducing effect with an IC₅₀ (A β_{42}) = 38 μ M. The salicylic acid locks the extended carbon chain in a *Z*-configuration resulting in close positioning of the carboxylic acid. Equipotent A β_{42} level reducing activity compared to **10c** was achieved by a tetronic acid (**10d**) and a tetramic acid (**10e**), which are rarely employed as carboxylic acid isosteres. Only a sterically more demanding tetronate (**10f**) displayed a full inhibitory mode of action. (Scheme 3)

Scheme 3.^a Synthesis of the higher substituted tetronate (**10f**).

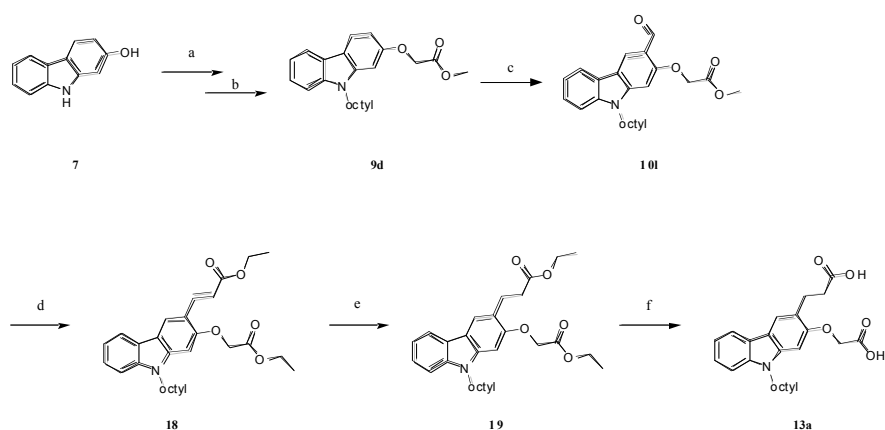


^aReagents: (a) piperonal, Na(AcO)₃BH, DCE, rt, 5 h; (b) bromoacetyl bromide, TEA, DCM, rt, 2,5 h; (c) **8**, K₂CO₃, acetone, rt; (d) KOtBu, THF, rt.

On the contrary, established isosteres like the tetrazoles (**10h**) or the 2,2,2-trifluoroethanol (**9a**) did not affect γ -secretase activity up to a concentration of 20 μ M or even caused increased A β ₄₂ secretion. The linear alcohol **10g** and bromide **9b** were inactive. However, the α -branched alcohol **6a** increases A β ₄₂ secretion.

The amines (**10i**, **11b-d**) did not show modulatory activity. The nitrile (**9c**) caused increased A β ₄₂ secretion, whereas the acidic sulfonimide (**6b**) showed reduction of the A β ₄₂ level. These results indicate the necessity of an acidic moiety on this scaffold to achieve modulatory activity. This confirmed our hypothesis that modulators interact with a basic amine on the substrate, because all sGSMs of this series exhibit a pK_a value in the range of 2-5.

Scheme 4. Synthesis of C3-substituted carbazole **13a**.



^aReagents: (a) octyl iodide, NaH, THF, DMF, -70°C-rt, 12 h; (b) bromoacetic acid methylester, K₂CO₃, acetone, rt, 12 h; (c) N,N-diisopropylformamide, POCl₃, H₂O, DCE, 80°C, 2-5 d; (d) phosphonium salt, NaOEt, EtOH, 80°C, 20 h; (e) Pd/C, H₂, EtOH, HCl, rt, 24 h; (f) KOH, MeOH, rt/64°C, 2 d.

Additional substituents in the C-3 position of **3** revealed a tolerance for small functional groups like an aldehyde (**11e**), but an additional acetic acid side chain (**13a**) diminished activity (Scheme 4).

These findings suggest a defined binding pocket for the modulators.

Table 1. Activity report of *N*-octylcarprofen and *N*-octylcarbazole carboxylic acid isosteres.

Entry	Compd.	Compd. Code	R ¹	R ²	R ³	[%]		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
1	5a	BSc4053		H	Cl	n.d. ^c	n.d. ^c	50 ^a
2	6a	BSc4021		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	21 ^a
3	6b	BSc4056		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	32
4	8	BSc4029	-OH	H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
5	9a	BSc4062		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	12 ^a
6	9b	BSc4004		H	H	>40	>40	>40
7	9c	BSc3891		H	H	74 ^b	105 ^b	252 ^b
8	10a	BSc4005		H	H	>80	>80	>80
9	10b	BSc4079		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80

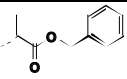




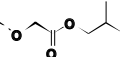
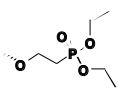
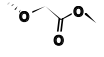

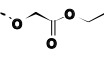
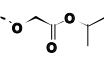
10	10c	BSc4003		H	H	23 ^a	>80	38
11	10d	BSc3972		H	H	21 ^a	>80	37
12	10e	BSc3990		H	H	8 ^a	72	28
13	10f	BSc3966		H	H	31	32	24
14	10g	BSc4030		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>40
15	10h	BSc3892		H	H	165 ^b	102 ^b	113 ^b
16	10i	BSc4019		H	H	>80	>80	>80
17	11a	BSc3985		H	H	>40	>40	>40
18	11b	BSc4122		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>10
19	11c	BSc4124		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
20	11d	BSc4123		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
21	11e	BSc4041		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	32
22	13a	BSc4050		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
23	13b	BSc4048		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	80

[a] EC₅₀ values are displayed, [b] Tested at 20 μ M, [c] not determined.

The methyl ester **9d** displayed unexpected A β_{42} level reducing activity with an IC₅₀ (A β_{42}) = 27 μ M, a marginal loss in activity compared to the carboxylic acid **3** with an IC₅₀ for A β_{42} of 19 μ M. Further investigation confirmed the tolerance of short linear esters. However, the activity decreased with increasing length of the ester. The ethyl ester **11f** showed A β_{42} level reducing activity (IC₅₀ (A β_{42}) = 31 μ M), but *iso*-propyl (**11g**) or *iso*-butyl ester (**10j**) did not reduce A β_{42} secretion. On the contrary, the tertiary butyl ester (**9e**) increased A β_{42} levels at EC₅₀ = 19 μ M. Equally the phosphoric diethyl ester caused an increased A β_{42} secretion with an EC₅₀ (A β_{42}) = 13 μ M. These findings

suggest metabolic activation, e.g. an esterase releasing the active carboxylic acid. This esterase seems to tolerate short linear esters as substrates. This presumption was confirmed by investigation of the α -branched side chain of Carprofen-esters (**4**, **5b**, **c**), which did not alter γ -secretase activity. Consequently, short α , α' -linear esters fulfil criteria for a prodrug system in this cellular assay. This potential prodrug system is still under investigation. Finally, an additional aldehyde in the C-3 position (**10l**) of the methyl ester is not tolerated and resulted in straight γ -secretase inhibition.

Table 2. Activity report of *N*-octylcarbazole and *N*-octylcarprofen esters.

Entry	Compd.	Compd. Code	R ¹	R ²	R ³	[%]		
						A β ₃₈	A β ₄₀	A β ₄₂
1	4	BSc3018		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
2	5b	BSc4051		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	15 ^a
3	5c	BSc4052		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	21 ^a
4	9d	BSc4028		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	27
5	9e	BSc3029		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	19 ^a
6	10j	BSc3986		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
7	10k	BSc4006		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	13 ^a
8	10l	BSc4038			H	n.d. ^b	n.d. ^b	89
9	11f	BSc4057		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	31
10	11g	BSc4058		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	49 ^a

[a] EC₅₀ values are displayed.

As none of the acid isosteres displayed improved potency over the lead acid **3**, a closely related compound **20** (BSc3041) was selected for further investigations. Serendipitously, the C-9-derivative **20** showed a remarkable BBB permeation in APP_{swe} Tg mice at a single 10 mg/kg oral dosage

suspended in NaCl and gelatine. The plasma and brain concentration of the modulator were monitored over a period of 5 hours. The brain concentration was found to continuously increase to a plasma/brain ration of approximately 2:1 (Figure 1). However, no significant A β ₄₂ changes were observed at this timepoint. These unchanged A β levels were recently linked to the double transgenic mice exhibiting NSAID-resistant PS1 mutations.¹⁵⁻¹⁶ The remarkable brain permeation reduces the need for a potential prodrug system. However, the significant brain levels of the acid **20** do not imply localisation of the compound at the site required for modulatory activity.

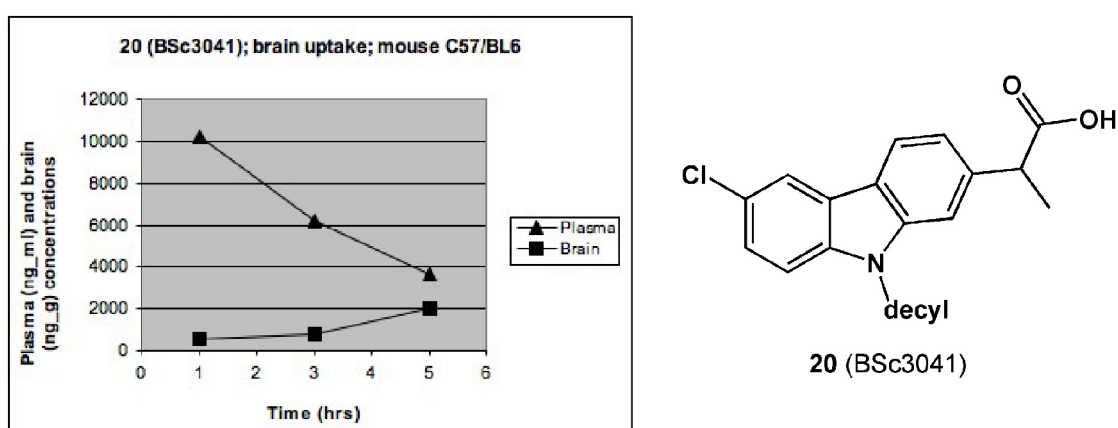


Figure 1. **20** (BSc3041) penetrate the BBB in C57/BLg mice at an oral dosage of 10 mg/kg.

We were able to replace the carboxylic acid by isosteres preserving modulatory activity. These finding confirm the necessity of an acidic proton on this class of γ -secretase modulators. Most sGSMs are found in a pKa-range of 2-5. This small pKa-range supports our hypothetical interaction with lysine⁶²⁴. The location of this lysine, directly at the membrane interface close to the GxxxG dimerization motif, suggests a modulation mechanism as an APP dimerization inhibitor, shifting the cleavage site to the less toxic A β ₃₈. The optimum spacer length between the aryl backbone and carboxylic acid was determined to be 2-3 carbon or oxygen atoms. However, introduction of a rigid aryl spacer allowed an elongation of up to 4 atoms. We identified a potential prodrug system based on short linear esters, which complements the remarkable BBB penetrations of the free acid **20**.

Experimental

General Experimental Informations. The ¹H and ¹³C spectra were recorded on a Bruker AC 300 (300

MHz) and AC 500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) adjusted to the central line of the deuterated solvent (MeOD, CDCl₃, d⁶-DMSO, Acetone-d). Mass spectrometry was performed on a Bruker-Franzen Esquire LC mass spectrometer (ESI) and a double focused MAT 95 (EI). HPLC analysis was performed on an Agilent 1100 system.

Purity Determination. Analytical reversed phase high-performance liquid chromatography was performed on an Agilent 1100 HPLC system, equipped with an auto sampler. The purity of the final compounds was determined using UV detection (λ = 245 nm). The chromatographic method employed the following: column Zorbax Eclipse XDB-C18; 4.6 x 150 mm; mobile phase A H₂O (0.1% TFA), mobile phase B acetonitrile, flow rate 1 mL/min, gradient elution 30 to 100% B over 15 min. According to these methods the purities for all compounds were \geq 95% if not other mentioned in the experimental details.

2-Hydroxy-*N*-octylcarbazole **8** (BSc4029)

To a suspension of NaH (0.820 g, 20.48 mmol) in THF (20 mL) under argon atmosphere was added 2-hydroxycarbazole (1.50 g, 8.19 mmol) at a temperature of 0°C. After 30 min stirring octylbromide (1.500 g, 7.78 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to warm to rt. After 12 h the reaction mixture was quenched by drop wise addition of H₂O until gas formation ceased. The obtained mixture was extracted three times with CH₂Cl₂ (30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, concentrated in vacuo and purified by silica gel column chromatography (gradient starting with cyclohexane to cyclohexane: CH₂Cl₂ 1:2) to give 1.580 g (74%) of **8** (BSc4029) as a colourless solid.

HPLC: 9.2 min (96%), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.19 (td, *J* = 7.0, 1.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 4.81–5.43 (b.s., 1H), 4.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.82 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.20–1.41 (m, 10H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm, ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 154.7, 141.9, 140.6, 124.4, 123.0, 121.2, 119.4, 118.9, 116.9, 108.4, 108.0, 95.0, 43.1, 31.8, 29.4, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6, 14.1 ppm, MS (*m/z*, 70 eV, ESI) = 318.4 [M+Na].

2-(2-Bromoethoxy)-9-octyl-9*H*-carbazole **9b** (BSc4004)

According to general procedure for ether formation (see supporting information): **8** (BSc4029) (0.100 g, 0.34 mmol), 1,2-dibromoethane (0.180 g, 0.97 mmol) and K₂CO₃ (0.141 g, 1.02 mmol), acetone (30 mL) yield 80 mg (51%) **9b** (BSc4004) as colourless solid.

HPLC: 10.8 min (98%), ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.44-7.35 (m, 2H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.90 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 4.43 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 4.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.74-3.69 (m, 2H), 1.90-1.82 (m, 2H), 1.44-1.23 (m, 10H), 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm, ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 157.3, 141.6, 140.7, 124.6, 122.9, 121.1, 119.6, 118.9, 117.5, 109.5, 107.3, 94.8, 68.6, 43.1, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6, 14.0 ppm.

2-(9-Octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-ethanesulfonic acid **10b** (BSc4079)

To a solution of **9b** (BSc4004) (0.020 g, 0.05 mmol) in a mixture of H₂O (0.050 mL) and dioxane (0.050 mL) was added Na₂SO₃ (0.032 g, 0.25 mmol) and the resulting mixture was heated at 160°C under microwave irradiation until the reaction was completed (TLC control). The reaction mixture was concentrated in vacuo, the resulting solid dissolved in EtOHabs. and concentrated in vacuo to give 0.007 g (35%) of **10b** (BSc4079) as a colourless solid. HPLC: 7.0 min (93%), ¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.97-7.94 (m, 1H), 7.93 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.37-7.30 (m, 1H), 7.18-7.10 (m, 1H), 6.84 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.32 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 4.53-4.47 (m, 2H), 3.38-3.33 (m, 2H), 1.89-1.81 (m, 2H), 0.86 (m, 10H), 1.32-1.24 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm, ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD): δ = 143.1, 142.0, 125.3, 124.3, 121.8, 120.2, 119.8, 118.2, 109.7, 109.1, 100.5, 95.2, 65.3, 51.9, 43.7, 32.9, 30.7, 30.3, 29.9, 28.2, 23.6, 14.4 ppm, MS (m/z, 70 eV, ESI) = 402 [M-].

ACKNOWLEDGMENT: We thank the BMBF (B.S., N.H., A.Z. KNDD) for support of this work.

SUPPORTING INFORMATION: All further synthetic procedures and spectral data of the tested compounds and method description of the *in vivo* mouse experiment.

REFERENCES

1. Beher, D.; Wrigley, J. D.; Owens, A. P.; Shearman, M. S., Generation of C-terminally truncated A β peptides is dependent on γ -secretase activity. *J. Neurochem.* **2002**, 82 (3), 563-575.
2. Wolfe, M. S., The γ -secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry* **2006**, 45 (26), 7931-7939.
3. Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H., Assembly, trafficking and function of γ -secretase. *Neurodegener. Dis.* **2006**, 3 (4-5), 275-283.
4. Brunkan, A. L.; Goate, A. M., Presenilin function and γ -secretase activity. *J. Neurochem.* **2005**, 93 (4), 769-792.
5. Kimberly, W. T.; Xia, W.; Rahmati, T.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J., The Transmembrane Aspartates in Presenilin 1 and 2 Are Obligatory for γ -Secretase Activity and Amyloid β -Protein Generation. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (5), 3173-3178.
6. Steiner, H.; Fluhner, R.; Haass, C., Intramembrane proteolysis by γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (44), 29627-29631.
7. Baumann, S.; Hoettecke, N.; Narlawar, R.; Schmidt, B., γ -Secretase as a target for AD. *Med. Chem. Alzheimer's Dis.* **2008**, 193-224.
8. Brown, M. S.; Ye, J.; Rawson, R. B.; Goldstein, J. L., Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **2000**, 100 (4), 391-398.
9. Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bulter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E.

H., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β_{42} independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, *414* (6860), 212-216.

10. Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Bann, M. A.; Fraering, P. C.; Narlawar, R.; Maharvi, G. M.; Healy, B.; Chapman, R.; Welzel, A. T.; Price, R. W.; Moore, B.; Rangachari, V.; Cusack, B.; Eriksen, J.; Jansen-West, K.; Verbeeck, C.; Yager, D.; Eckman, C.; Ye, W.; Sagi, S.; Cottrell, B. A.; Torpey, J.; Rosenberry, T. L.; Fauq, A.; Wolfe, M. S.; Schmidt, B.; Walsh, D. M.; Koo, E. H.; Golde, T. E., Substrate-targeting γ -secretase modulators. *Nature* **2008**, *453* (7197), 925-929.

11. Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C.; Pipkorn, R.; Schaefer, M.; Langosch, D.; Multhaup, G., GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β_{42} . *Embo J.* **2007**, *26* (6), 1702-1712.

12. Baumann, S.; Hoettecke, N.; Schubel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B., NSAID-derived γ -secretase modulators. Part III: Membrane anchoring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (24), 6986-6990.

13. Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Baumann, K.; Schubel, R.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B., *N*-Substituted carbazolyloxyacetic acids modulate Alzheimer associated γ -secretase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (1), 176-182.

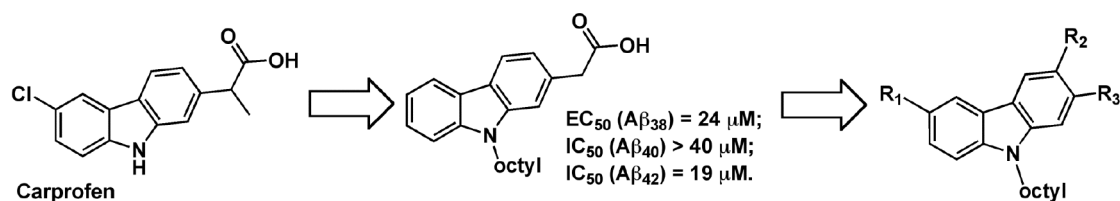
14. Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B.; Baumann, K., Scaffold of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor carprofen provides Alzheimer γ -secretase modulators. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7588-7591.

15. Czirr, E.; Leuchtenberger, S.; Dorner-Ciossek, C.; Schneider, A.; Jucker, M.; Koo, E. H.; Pietrzik, C. U.; Baumann, K.; Weggen, S., Insensitivity to A β_{42} -lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and γ -secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (34), 24504-24513.

16. Page, R. M.; Baumann, K.; Tomioka, M.; Perez-Revuelta, B. I.; Fukumori, A.; Jacobsen, H.;

Flohr, A.; Luebbers, T.; Ozmen, L.; Steiner, H.; Haass, C., Generation of A β ₃₈ and A β ₄₂ is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and γ -secretase modulation. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (2), 677-683.

Table of contents graphic



Auszüge der zu dieser Veröffentlichung gehörenden „Supporting Informations“ finden sich im Experimentellen Teil in Kapitel 4.3.1.

3.3 Kinetik der Amyloid-Plaque-Bildung und deren Wachstum in Tg2576 Mäusen

Die Untersuchungen auf dem Gebiet der ursächlichen Entstehung von AD werden wie in der Einleitung beschrieben oft am Mausmodell mit kranialem Fenster untersucht. Die dabei verwendeten genetisch manipulierten Mäuse bilden die als Ursache der AD angesehenen A β oder Tau-Protein-Ablagerungen, in krankhaftem Maße mit ähnlichen kognitiven Auswirkungen. Die Entstehung und das Wachstum der pathologischen Amyloiden-Plaques können dabei mikroskopisch nachverfolgt werden. Das dafür benötigte Fluorophor (**BSc3924**) wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Autoren: Steffen Burgold, Tobias Bittner, Daniel Kieser, Martin Fuhrmann, Mario M. Dorostkar, Gerda Mitteregger, Hans Kretzschmar, Boris Schmidt & Jochen Herms.
Titel: „Kinetics of amyloid plaque formation and growth in Tg2576 mice“.
Journal: *Acta Neuropathologica* **2011**, 121(3), 327-335.

Zusammenfassung:

Die Kinetik der Amyloid-Plaque Bildung und deren Wachstum als eines der wichtigen Kennzeichen der AD ist von fundamentaler Bedeutung in der AD Forschung. Mittels Langzeit zwei Photonen *in vivo* Imaging wurden einzelne Methoxy-XO4 (**BSc3924**) gefärbte amyloide Plaques über 6 Wochen in 12 und 18 Monate alten Tg2576 Mäusen beobachtet. Wir beobachteten, dass in den 12 Monate alten Mäusen neu auftretende Plaques anfangs ein kleines Volumen hatten, über die Zeit aber größer wurden. Die Plaques, die am Anfang bereits beobachtet werden konnten, wuchsen ebenfalls über die Zeit, aber langsamer im Vergleich zu den neuen Plaques. Zusätzlich untersuchten wir 18 Monate alte Tg2576 Mäuse, bei denen wir über einen 6-wöchigen Beobachtungszeitraum weder neu auftretende Plaques noch ein signifikantes Wachstum von vorher bereits vorhandenen Plaques feststellen konnten. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass neu entstandene Plaques initial ein kleines Volumen haben, das über die Zeit anwächst, bis kein weiteres Plaque-Wachstum in gealterten Mäusen beobachtet werden kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Behandlung, die auf eine Reduktion der Plaquebildung abzielt, in einem frühen Entwicklungsstadium der Krankheit am effektivsten ist.

Mit freundlicher Genehmigung von Acta Neuropahtol. All rights reserved.

In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks

Steffen Burgold · Tobias Bittner · Mario M. Dorostkar · Daniel Kieser ·
Martin Fuhrmann · Gerda Mitteregger · Hans Kretschmar ·
Boris Schmidt · Jochen Herms

Received: 1 October 2010 / Revised: 25 November 2010 / Accepted: 27 November 2010
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The kinetics of amyloid plaque formation and growth as one of the characteristic hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are fundamental issues in AD research. Especially the question how fast amyloid plaques grow to their final size after they are born remains controversial. By long-term two-photon in vivo imaging we monitored individual methoxy-X04-stained amyloid plaques over 6 weeks in 12 and 18 months old Tg2576 mice. We found that in 12 months old mice, newly appearing amyloid plaques were initially small in volume and subsequently grew over time. The growth rate of plaques was inversely proportional to their volume; thus amyloid plaques that were already present at the first imaging time point grew over time but slower compared to new plaques. Additionally, we analyzed 18 months old Tg2576 mice in which we neither found newly appearing plaques nor a significant growth of pre-existing plaques over 6 weeks of imaging. In conclusion, newly appearing amyloid plaques are initially small in size but grow over time until plaque growth can not be detected anymore in aged mice. These results

suggest that drugs that target plaque formation should be most effective early in the disease, when plaques are growing.

Keywords Alzheimer's disease · Amyloid plaque · A β , plaque growth · Tg2576 · Two-photon · In vivo · Imaging

Introduction

Amyloid plaques represent one of the major hallmarks of Alzheimer's disease (AD) pathology. They are comprised of fibrillar aggregates of the amyloid- β -peptide which has been shown to have synaptotoxic effects [10, 17, 18, 23]. In AD patients as well as in animal models synapse loss is most prominent in close proximity to amyloid plaque deposits which indicates a link between amyloid plaques and synaptotoxicity [7, 14, 15, 19–21]. Therefore, elucidating the process of amyloid plaque formation and growth may reveal important targets for therapeutic interventions to stop the progression of synapse loss and consequently cognitive decline in AD.

In vitro studies of plaque formation established a model in which a seed of fibrillar A β is formed first and plaques grow subsequently around these seeds in a time- and concentration-dependent manner [4, 11]. These findings were corroborated by in vivo imaging studies of AD transgenic (APP/PS1) mice, which reported a change in size of a subset of plaques [2] or a gradual growth of almost all plaques, which was faster in smaller plaques and younger animals [24]. These findings, however, are contrasted by different studies, which reported that A β plaques appeared rapidly in both APP/PS1 and Tg2576 transgenic mice [16] and that these were relatively stable over time in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-010-0787-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Burgold · T. Bittner · M. M. Dorostkar · M. Fuhrmann ·
G. Mitteregger · H. Kretschmar · J. Herms (✉)
Center of Neuropathology and Prion Research,
Ludwig Maximilians Universität, Feodor-Lynen-Str. 23,
81377 Munich, Germany
e-mail: jochen.herms@med.uni-muenchen.de

D. Kieser · B. Schmidt
Clemens Schoepf Institute for Organic Chemistry
and Biochemistry, Technical University,
64287 Darmstadt, Germany

Tg2576 transgenic mice [3]. The apparent discrepancies of the *in vivo* studies may be attributed to a different preparation of the cranial window (e.g., thinned skull vs. open skull preparations), the age of the mice, or different disease models (e.g., APP/PS1 or Tg2576). In order to reconcile these findings, we studied the appearance of A β plaques in detail. We followed plaque formation in 12 and 18 months old Tg2576 mice by measuring the volume, as well as area, over a period of 6 weeks. While we used an open skull preparation, we started our imaging protocol 3 weeks after surgery, so that possible artifacts from inflammatory reactions [8] were minimized.

Using this approach, we found that plaques appeared and increased in volume in 12 months old, but not in 18 months old mice. Nascent plaques were initially small in volume and grew over time. Pre-existing plaques, in contrast, had a larger volume and grew slower compared to newly formed ones. These findings demonstrate that A β plaques grow in a size-dependent manner in young (12 months) mice, while no growth was observed in older (18 months) mice.

Materials and methods

Transgenic mice

Heterozygous Tg2576 [9] mice (B6;SJL-Tg(APP^{SWE})2576Kha from Taconic, Cologne, Germany) were crossed with heterozygous YFP-H [5] mice (B6.Cg-Tg(Thy1-YFP^H)2Jrs/J) from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) expressing yellow fluorescent protein (YFP) in a subset of cortical neurons. YFP-labeled neurons served as a counterstaining to find the same imaging positions over and over again in subsequent time points. Mice were of both sexes and were group housed under pathogen-free conditions until surgery, after which they were singly housed. All procedures were performed in accordance with an animal protocol approved by the University of Munich and the Government of Upper Bavaria (55.2-1.54-2531-110-06).

Open-skull surgery

A cranial window over the right cortical hemisphere was surgically implanted as previously described [1, 6, 8]. The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (0.13/0.01 mg/g body weight). Additionally, dexamethasone (0.02 ml at 4 mg/ml) was intraperitoneally administered immediately before surgery (Holtmaat et al. 2005). A circular piece of the skull (4 mm in diameter) over the right somatosensory cortex (centered over the parietal bone, approx. 5.5 mm caudal from the

bregma and 5.5 mm lateral of the midline) was removed using a dental drill (Schick-Technikmaster C1; Pluradent; Offenbach, Germany). Immediately, a round coverslip (5 mm diameter) was glued to the skull using dental acrylic (Cyano-Veneer fast; Heinrich Schein Dental Depot, Munich, Germany) to close the craniotomy. A small metal bar, containing a hole for a screw, was glued next to the coverslip to allow repositioning of the mouse during subsequent imaging sessions. After surgery, mice received a subcutaneous analgesic dose of carprofen (Rimadyl; Pfizer, New York, USA) for 3 days (5 mg/kg). Imaging began following a 21 day rest period after surgery.

Long-term two-photon *in vivo* imaging

Long-term two-photon imaging was performed as previously described [1, 6]. Less than 50 mW laser power was delivered to the tissue to avoid laser-induced phototoxicity. For amyloid plaque staining, methoxy-X04 [13] was intraperitoneally injected 24 h before every imaging session. Initially, we administered doses of 2.4 mg/kg. However, in an attempt to reduce methoxy-X04 usage, we changed the dosing regimen to an initial loading dose of 2.0 mg/kg before the first imaging session and subsequent weekly maintenance doses of 0.4 mg/kg, which did not affect the signal-to-noise ratio (data not shown). Furthermore, we found no significant difference in plaque growth between these two dosing regimens (Supplementary Fig. S1a), therefore we pooled the data for all further analyses. To determine whether repeated administration of methoxy-X04 increased the apparent volume of plaques by increasing the brightness, we correlated plaque volumes with the mean intensity of the fluorescence values of all voxels in a plaque (Supplementary Fig. S1b). The correlation between plaque volume and intensity was weak ($R^2 = 0.25$) compared to data obtained by imaging fluorescent beads with varying laser intensities to simulate increasing brightness ($R^2 = 0.71$; data not shown). Considering that no plaque growth was observed in older animals despite the same dosing scheme and that comparably little plaque growth was observed with daily administration of methoxy-X04 (Supplementary Fig. S2), changes in plaque volumes cannot be attributed to increased brightness due to methoxy-X04 accumulation.

YFP and methoxy-X04 were excited by a Ti:Sa laser (MaiTai, Spectra-Physics, Darmstadt, Germany) at 880 and 750 nm and the emission was collected from 527 to 582 nm and 460 to 500 nm, respectively (LSM 5MP, Zeiss, Jena, Germany). A Zeiss 20 \times water-immersion objective (1.0 NA) was used to acquire image stacks of 425 \times 425 \times 300 μm^3 with 3 μm z-resolution and 1,024 \times 1,024 pixels per image frame (0.41 μm /pixel). In subsequent imaging sessions, previously imaged volumes were identified by

eye, based on the positions of blood vessels, neuronal cell bodies and processes, as well as plaques. This allowed the precise alignment of the same imaging volume over a period of 6 weeks. The laser intensity was adjusted to keep the emitted YFP fluorescence stable.

Image processing and data analysis

The 3D images were deconvolved (AutoDeblur, Version x2.0.1, Media Cybernetics, Bethesda, USA) and contrast-normalized (i.e., based on the average and standard deviation of intensities of 3D stacks; Imaris 6.2.1, Bitplane, Zurich, Switzerland). For 3D analysis, we used surface rendering by Imaris software which also calculated the volume of individual plaques over time period. The 2D analysis was performed in maximum intensity projections applying a threshold of mean intensity + twice standard deviation of a representative background region. The volume growth of individual plaques was quantified as the slope of a linear fit of the volumes measured at each time point. We used repeated measures ANOVA and Student's *t*-test to test significance. All data are presented as mean \pm SD, and 95% confidence intervals (95% CI) are given where appropriate.

Results

We imaged 83 individual amyloid plaques in 12 months old Tg2576 mice [9] ($n = 8$) for up to 6 weeks (Fig. 1a). Volumes of individual plaques were three-dimensionally (3D) surface-rendered, quantified, and tracked over time (Fig. 1b). To compare the growth of plaques of various sizes, we normalized the volume of individual plaques to their volume at the first imaging session (week 0). In total, we detected the appearance of 25 new plaques during the imaging period of 6 weeks. Initially, these newborn plaques had an average volume of $255 \pm 231 \mu\text{m}^3$ (95% CI, $159\text{--}350 \mu\text{m}^3$; Fig. 2) and exhibited a significant volume increase of $2,015 \pm 1,783\%$ over 6 weeks based on a linear regression (Fig. 3a–c; $P < 0.001$, $R^2 = 0.97$). The initial area of newborn plaques, as determined from the maximum intensity projection, was $33.8 \pm 21.6 \mu\text{m}^2$ (95% CI, $24.5\text{--}43.2 \mu\text{m}^2$) and they exhibited a significant area increase of $591 \pm 409\%$ over 6 weeks based on a linear regression (Fig. 3d; $P < 0.001$, $R^2 = 0.95$). Plaques that were not observed in their nascent stage, so called pre-existing plaques ($n = 58$) had an initial average volume of $7,575 \pm 15,599 \mu\text{m}^3$ (95% CI, $3,473\text{--}11,676 \mu\text{m}^3$; Fig. 2) and an initial average area, as determined from the

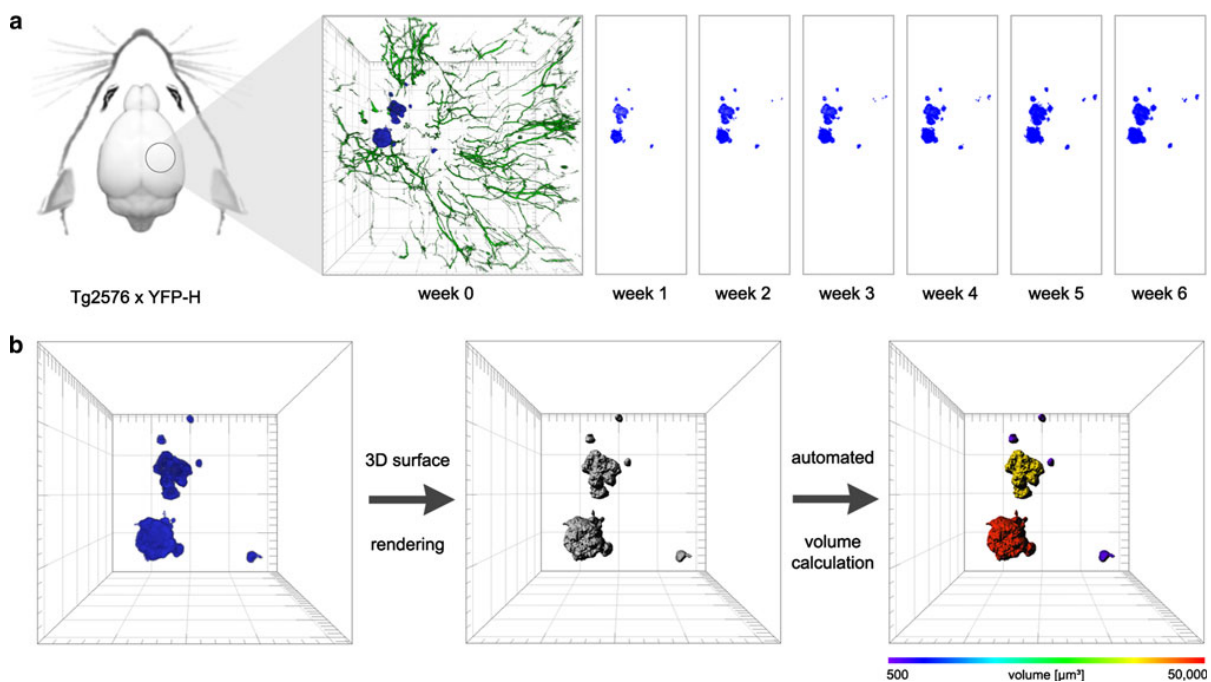


Fig. 1 Long-term two-photon in vivo imaging of amyloid plaques. **a** Schematic of a cranial window implanted over the somatosensory cortex of a Tg2576 mouse that was crossed with YFP-H. A volume rendered z-stack with perspective view (45°) shows amyloid plaques in blue (stained with methoxy-X04) and YFP-labeled dendrites in green at week 0 which was the first imaging time point. Amyloid

plaques were followed over 6 weeks with weekly imaging time points illustrated as maximum intensity projections. **b** Illustration of the image analysis with Imaris software. After the amyloid plaques in the raw images were 3D surface rendered, the software automatically calculated the plaque volume which was then color-coded. Major ticks show $50 \mu\text{m}$

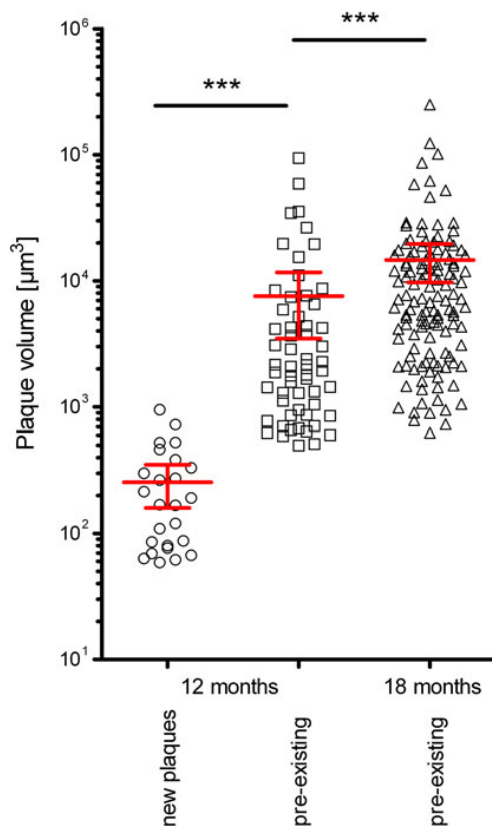


Fig. 2 Distribution of amyloid plaque volumes. Distribution of amyloid plaque volumes between individual newborn ($n = 25$) and pre-existing plaques ($n = 58$) in 12 months old Tg2576 and pre-existing plaques ($n = 128$) at 18 months of age. The red bars show mean and 95% CI. *** $P < 0.001$ (Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-hoc test)

maximum intensity projection, of $141.0 \pm 262.1 \mu\text{m}^2$ (95% CI, $73.3\text{--}208.7 \mu\text{m}^2$). Both volume as well as area was significantly higher compared to newborn plaques ($P < 0.001$). These pre-existing plaques exhibited a significant linear volume increase of $426 \pm 313\%$ over 6 weeks (Fig. 4a–c, $P < 0.001$, $R^2 = 0.99$), whereas the area increased by $282 \pm 123\%$ over 6 weeks based on a linear regression (Fig. 4d; $P < 0.001$, $R^2 = 0.97$). Collectively, all amyloid plaques analyzed in 12 months old Tg2576 mice significantly gained volume and area over 6 weeks ($P < 0.001$). In contrast, we neither detected newly appearing plaques, nor a significant increase in plaque volume in 18 months old Tg2576 mice over 6 weeks (Fig. 5; $n = 126$ plaques in three mice). At this age, amyloid plaques had an average volume of $14,632 \pm 27,811 \mu\text{m}^3$ (95% CI, $9,729\text{--}19,536 \mu\text{m}^3$; Fig. 2), which is significantly higher than at 12 months (Fig. 2, $P < 0.001$). We also determined the sphericity of the larger, pre-existing plaques, which is defined as the ratio of the surface

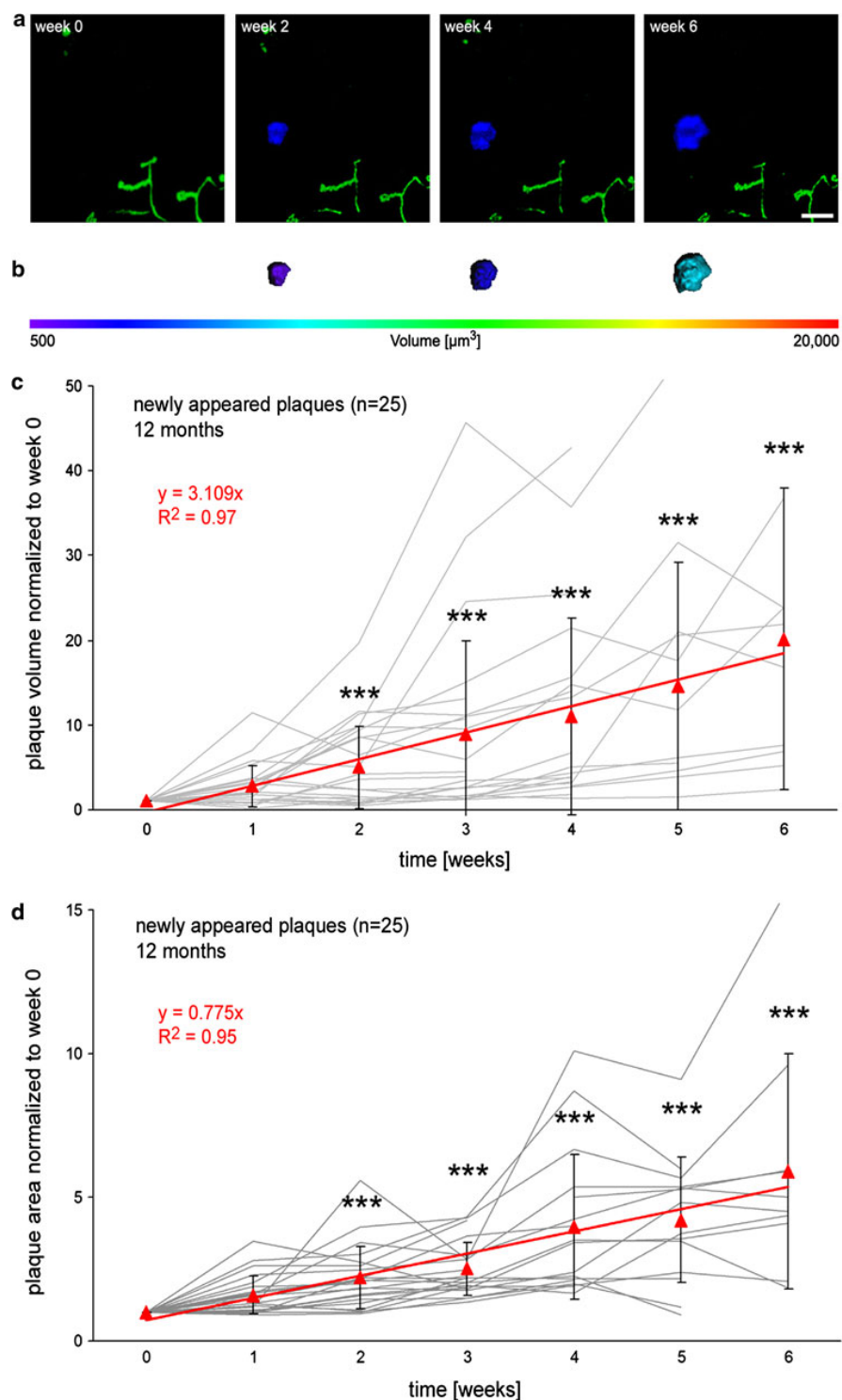
area of a sphere which has the same volume as the given plaque to the surface area of the plaque [22]. On average, the sphericity of $n = 101$ plaques was 0.86 ± 0.07 (95% CI, $0.84\text{--}0.87$), which differed significantly from 1 (i.e., a perfect sphere; Wilcoxon signed rank test, $P < 0.0001$). Finally, we quantified the growth of individual plaques as the slope of a linear fit of the normalized volumes measured at each time point and plotted these against the initial volumes of each respective plaque (Fig. 6). This analysis shows a slight overlap in volumes of newborn and pre-existing plaques (Fig. 6a). This is most likely due to the sampling rate of plaque volumes (i.e., weekly), so that plaques labeled as “newborn” may have existed for up to a week before we detected them for the first time. More importantly, however, we found that in young (12 months) mice, plaque growth is directly related to the volume of a plaque (Fig. 6a), whereas most plaques in older (18 months) mice show very little, if any, growth (Fig. 6b).

Discussion

We monitored the appearance and growth of A β plaques in Tg2576 mice by in vivo two-photon microscopy of animals pretreated with methoxy-X04, which stains A β plaques. As a model, we used Tg2576 mice, which overexpress a human APP transgene containing the Swedish FAD mutation (K670N/M671L), and display the slowest amyloid pathology [9] of all the models analyzed by Meyer-Luehmann et al. [16]. We reasoned that if we were able to detect amyloid plaque growth in this model, then it should also be detectable in other mouse models with a faster amyloid pathology.

In summary, we showed that in the early stages of amyloid pathology in Tg2576 mice, newborn plaques are initially small in size and grow over time. These findings are in contrast to the previous study by Meyer-Luehmann et al. [16] which found that plaques appeared very rapidly (within 24 h) and did not change significantly in size thereafter. One possible reason for the differing results might be the fact that we primarily quantified volume, rather than area. However, even when we quantified plaque size as an area, that area steadily increased over 6 weeks (Figs. 3d, 4d). Thus, quantification of the plaques in three dimensions does not account for the observed difference. Another possibility is that open-skull surgery induces local inflammation and gliosis in the first weeks after surgery [8], which may affect plaque growth [24]. Therefore, in contrast to Meyer-Luehmann et al. [16], we waited for 3 weeks before imaging, so that possible inflammatory responses could abate. Yet even when we started daily imaging immediately after cranial window surgery, we were able to

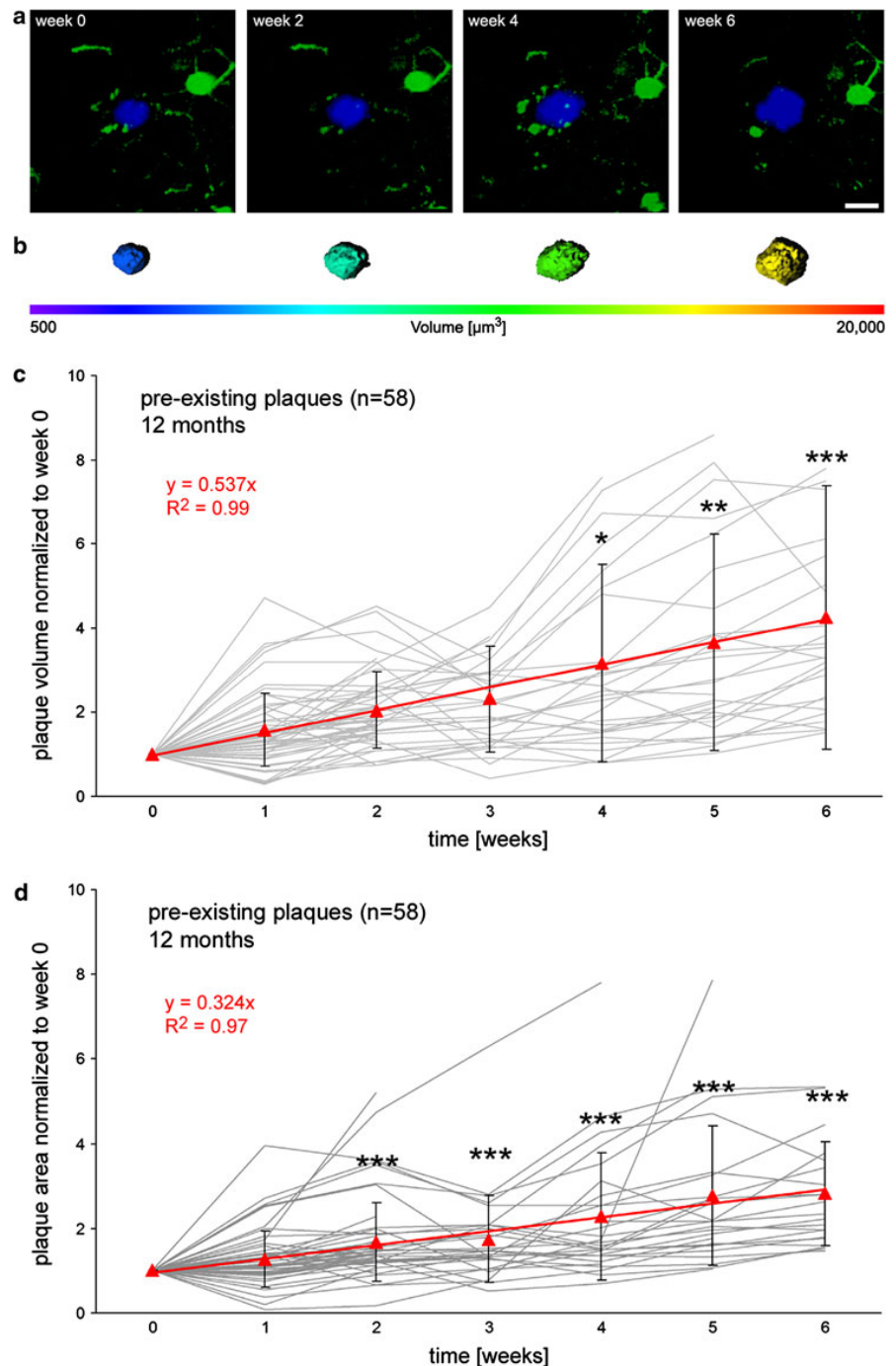
Fig. 3 Growth of newborn amyloid plaques in 12 months old Tg2576. **a** Maximum intensity projections of a time series of 3D images acquired with two-photon in vivo imaging in 12 months old Tg2576 mice. A newborn amyloid plaque (stained with methoxy-X04) is displayed in *blue* and YFP-labeled dendrites in *green*. This newborn plaque is not apparent at week 0 but emerges at week 2. **b** In the following weeks, the nascent plaque considerably increased in size indicated by color-coded surface rendered objects. **c** The diagram shows normalized volumes of 25 individual newborn plaques (*grey lines*) based on the volume of first appearance. Week 0 is set as the time-point of first appearance. Average plaque volumes (*red triangles*), and linear regression of average plaque volume (*red line*) over 6 weeks are displayed. **d** The diagram shows normalized areas of 25 individual newborn plaques (*grey lines*) based on the area of first appearance. Week 0 is set as the time-point of first appearance. Average plaque areas (*red triangles*), and linear regression of average plaque volume (*red line*) over 6 weeks are displayed. *Error bars* show standard deviation. *** $P < 0.001$; *Scale bars* show 10 μm



measure plaque growth. Initial plaque volumes were $92.1 \pm 64.5 \mu\text{m}^3$ (95% CI, $60.0\text{--}124 \mu\text{m}^3$; $n = 18$). However, a significant increase in plaque volume was only

detected if we monitored plaque sizes for more than 16 days (Supplementary Fig. S2). Thus, delayed imaging 3 weeks after surgery does not account for the observed

Fig. 4 Growth of pre-existing amyloid plaques in 12 months old Tg2576. **a** Maximum intensity projections of a time series of 3D images acquired with two-photon in vivo imaging in 12 months old Tg2576 mice. A pre-existing amyloid plaque (stained with methoxy-X04) is displayed in *blue* and YFP-labeled dendrites in *green*. This plaque is already apparent at week 0. **b** In the following weeks, the plaque considerably increased in size indicated by color-coded surface rendered objects. **c** The diagram shows normalized volumes of 58 individual plaques (*grey lines*) based on the volume at the first imaging time-point (week 0). Average plaque volumes (*red triangles*), and linear regression of average plaque volume (*red line*) over 6 weeks are displayed. **d** The diagram shows normalized areas of 58 individual plaques (*grey lines*) based on the volume at the first imaging time-point (week 0). Average plaque areas (*red triangles*), and linear regression of average plaque area (*red line*) over 6 weeks are displayed. Error bars show standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Scale bars show 10 μm



differences, either. We identified, however, two factors which determined if plaque growth can be observed in Tg2576 mice; first, and most importantly, we found that plaque growth can only be detected after a sufficiently long observation period. We monitored plaques for six consecutive weeks and detected that a statistically significant

change in plaque volume of newborn plaques was achieved not earlier than 2 weeks after their first appearance (Fig. 3c), whereas a statistically significant change in plaque volume of pre-existing plaques was achieved not earlier than 4 weeks after the initial measurement (Fig. 4c). Second, we also found that the age of the observed animals

Fig. 5 Growth of pre-existing amyloid plaques in 18 months old Tg2576. **a** Maximum intensity projections of a time series of 3D images acquired with two-photon in vivo imaging in 18 months old Tg2576 mice. A pre-existing amyloid plaque (stained with methoxy-X04) is displayed in *blue* and YFP-labeled dendrites in *green*. This plaque is already apparent at week 0. **b** In the following weeks, the plaque does not increase in size indicated by color-coded surface rendered objects. **c** The diagram shows normalized volumes of 126 individual plaques (*grey lines*) based on the volume at the first imaging time-point (week 0). Average plaque volumes (*red triangles*), and linear regression of average plaque volume (*red line*) over 6 weeks are displayed. *Error bars* show standard deviation. *Scale bars* show 10 μm

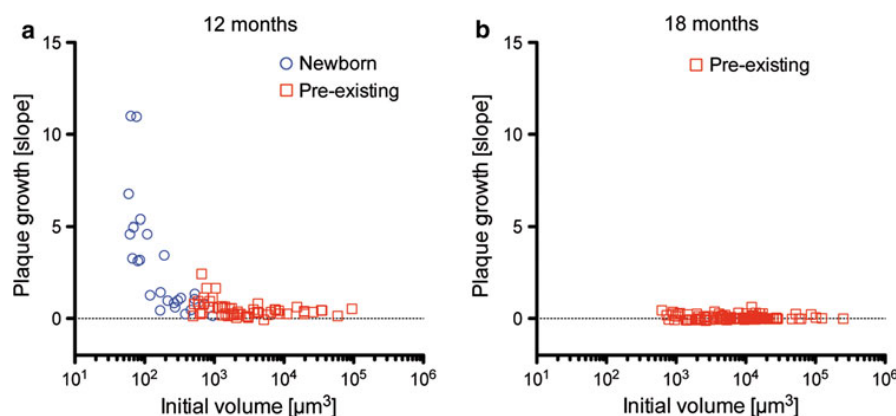
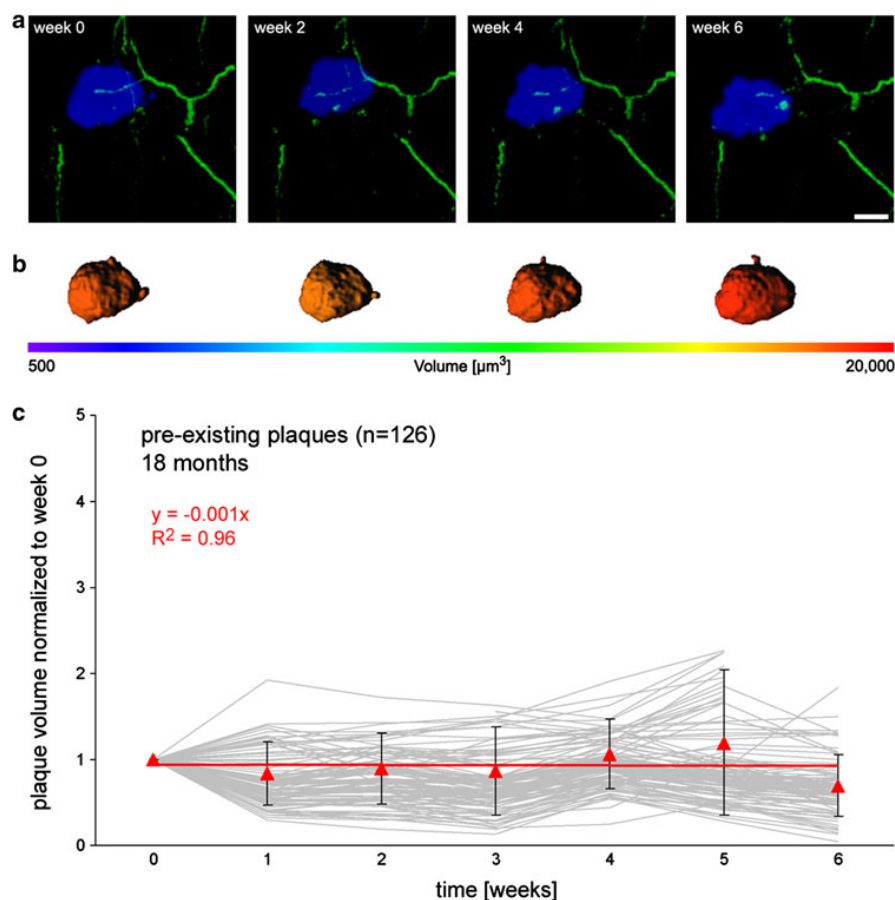


Fig. 6 Relationship between growth and initial volume of amyloid plaques. The growth of amyloid plaques is quantified as the slope of a linear fit of the normalized volumes measured at each time point and is shown as a function of the initial volume of plaques. **a** Data from

12 months old animals. Newborn plaques are shown in *blue* and pre-existing plaques in *red*. **b** Data from 18 months old animals. No newborn plaques were detected at that age. Pre-existing plaques are shown in *red*

plays an important role; we detected plaque growth in 12 months old mice, whereas 18 months old mice showed no significant overall growth of plaques (Figs. 5c, 6),

which was shown before by Christie et al. [3]. Glial interaction with amyloid deposits has previously been suggested as a possible explanation for this observation in

old mice [3]. However, we would further like to propose the possibility that the high number of existing amyloid plaques at this age and therefore the large total surface area where newly formed A β fibrils can attach to existing plaques could lead to a decelerated growth of each individual plaque up to a degree that it is not detectable by two-photon in vivo imaging anymore. It is furthermore interesting to note that plaque size varied widely in 18 months old animals (Fig. 2); yet we observed no newborn plaques at that age (Fig. 6). Individual plaques, however, seemed both to shrink and grow between measurements (Fig. 5). While this suggests the exciting possibility that plaques might be in a dynamic equilibrium, increasing measurement errors with increasing plaque size (note the heteroscedasticity in Figs. 3c, 4c) preclude us from making a firm conclusion. Thus, our data show that both the appropriate age and an appropriate observation period are required in order to detect plaque growth. Furthermore, our findings corroborate results which showed plaque growth in different double-transgenic AD mouse models [2, 24].

In conclusion, we show that amyloid plaques do grow in 12 months old Tg2576 mice when amyloid pathology is in the early stages [9]. Newborn amyloid plaques are initially small in size and grow over the following weeks. After the initial growth period, plaques continue to grow, albeit more slowly, until plaque growth is not detectable anymore in aged mice. These findings have important implications for AD diagnosis and therapy. A recent study [12], for instance, showed that in patients with mild cognitive impairment (MCI), amyloid plaque load, as measured by ^{11}C -Pittsburgh compound B (PIB) retention in positron emission tomography, increased over 5 years, while the regional cerebral metabolic rate of glucose decreased. However, cognitive function remained stable in these patients. Patients with AD, in contrast, had higher PIB retention than patients with MCI, which did not increase further over the observation period, and showed a decline in the regional cerebral metabolic rate of glucose as well as in cognitive function. In combination with our results, these data suggest that plaque formation occurs early in the course of the disease, but before a loss of cognitive function becomes apparent. Therefore, drugs that target plaque formation should be most effective early in the disease, when plaques are growing. These results also suggest that a different mechanism may be responsible for the cognitive decline in patients with manifest AD. Thus, an effort has to be made to find the mechanism of cognitive decline in the late disease stages in order to tailor effective therapeutic strategies.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596, A13), the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, 01GZ0713, 13N9268), the German Federal Ministry of Economics and Technology (Bundesministerium für

Wirtschaft und Technologie, 16IN0675) and the European Union (Neuro.GSK3, FP-7-223276). Furthermore, the authors would like to thank Sonja Steinbach for her excellent technical assistance and Patrizia Bonert for her invaluable assistance in animal care.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

1. Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S et al (2009) gamma-Secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci* 29:10405–10409
2. Bolmont T, Haiss F, Eicke D et al (2008) Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 28:4283–4292
3. Christie RH, Bacskai BJ, Zipfel WR et al (2001) Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by in vivo multiphoton microscopy. *J Neurosci* 21:858–864
4. Esler WP, Stimson ER, Ghilardi JR et al (1996) In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry* 35:749–757
5. Feng G, Mellor RH, Bernstein M et al (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41–51
6. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CKE et al (2010) Microglial CX3CR1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13:411–413
7. Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB (2007) Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1097:30–39
8. Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow DK et al (2009) Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protocols* 4:1128–1144
9. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S et al (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99–102
10. Hsieh H, Boehm J, Sato C et al (2006) AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831–843
11. Jarrett JT, Lansbury PT (1993) Seeding one-dimensional crystallization of amyloid—a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. *Cell* 73:1055–1058
12. Kadir A, Almkvist O, Forsberg A et al (2010) Dynamic changes in PET amyloid and FDG imaging at different stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.015
13. Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA et al (2002) Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:797–805
14. Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J et al (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19:586–592
15. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T et al (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4012–4017
16. Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C et al (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720–724

17. Shankar GM, Li SM, Mehta TH et al (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837–842
18. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG et al (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051–1058
19. Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA et al (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25:7278–7287
20. Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD et al (2007) Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol* 171:1304–1311
21. Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7:1181–1183
22. Wadell H (1935) Volume, shape, and roundness of quartz particles. *J Geol* 43:250–280
23. Wei W, Nguyen LN, Kessels HW et al (2010) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13:190–196
24. Yan P, Bero AW, Cirrito JR et al (2009) Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J Neurosci* 29:10706–10714

3.4 Der bekannte Imaging Farbstoff Methoxy-XO4 eine vereinfachte Synthese und dessen Anwendung *in vivo*.

Die in der Einleitung und in Kapitel 3.3 beschriebene Forschung am Tiermodell erfordert neben verbesserten Fluorophoren auch eine Weiterentwicklung der bestehenden Mikroskopietechniken. Das verwendete Fluorophor Methoxy-XO4 (**BSc3924**) wurde im Rahmen dieser Arbeit auf einem modifizierten schutzgruppenfreien Syntheseweg hergestellt. Dabei wurden auch weitere Derivate mit teilweise verbesserten Eigenschaften hergestellt, die in Kapitel 3.6.2.4 genauer beschrieben werden.

Der Inhalt dieses Kapitels wird im März/April **2011** zur Veröffentlichung eingereicht.

Autoren: David K. Milford & Jasmin K. Hefendehl, Daniel Eicke, Stefan Grathwohl, Bettina M. Wegenast-Braun, Daniel Kieser, Mathias Jucker, Michael E. Calhoun
Titel: „Repeatable target location for long-term *in vivo* imaging of mice with multiphoton microscopy“.
Journal: Nature Methods, März/April **2011** eingereicht

Zusammenfassung:

Für die Erfassung von dynamischen strukturellen und funktionalen Veränderungen im Gehirn von Mausmodellen hat sich das Langzeit *in vivo* Imaging als unerlässliches Verfahren herausgestellt. Für den Erhalt von Zeitrafferaufnahmen der pathologischen Strukturen wurde ein spezielles Protokoll entwickelt. Es ermöglicht valide und vergleichbare Aufnahmen über Wochen und Monate. Die Beschreibung beinhaltet die Operationsvorbereitungen, neuartige, schnelle und vergleichende 2 Photonen-Mikroskopie sowie ein neues Kopffixierungssystem. Den Schwerpunkt bildet die Aufnahmetechnik. Das Kopffixierungssystem vermeidet Drehachsenveränderungen und reduziert dadurch die Datenmenge unbrauchbarer Bilderserien. Der Einfluss der Drehachsenveränderungen bei früheren Aufnahmeprotokollen wird erläutert. Die neue 2 Photonen-Mikroskopie-Methodik erlaubt maximale Reproduzierbarkeit und dreidimensionale Deckungsgleichheit. Die detaillierte Schilderung der Operation für das kraniale Fenster ist ebenso beschrieben, wie die spezifischen konstruktiven Vorgaben der Kopffixierung. Diese ermöglicht nach entsprechenden Konfigurierungsschritten halbautomatische wiederholte Aufnahmen der gleichen Hirnregionen, eine essentielle Entwicklung für größere Mengen an wiederholten *in vivo* Langzeitmessungen. Mit diesem Protokoll gelingt nach erfolgreicher Operation und einer initialen Bildaufnahmesitzung die Konfiguration für wiederholte Aufnahmen in weniger als 10 Minuten.

Repeatable target location for long-term *in vivo* imaging of mice with multiphoton microscopy

David K. Milford^{*1} & Jasmin K. Hefendehl^{*1,2,3}, Daniel Eicke¹, Stefan Grathwohl^{1,2,3}, Bettina M. Wegenast-Braun^{1,2}, Daniel Kieser⁴, Mathias Jucker^{1,2} and Michael E. Calhoun¹

* Authors contributed equally

¹Department of Cellular Neurology, Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany; ²DZNE - German Center for Neurodegenerative Diseases, D-72076 Tübingen, Germany; ³Graduate School for Cellular and Molecular Neuroscience, University of Tübingen, D-72074 Tübingen, Germany; ⁴Clemens Schoepf-Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, D-64287 Darmstadt, Germany

Words:

Figures: 5

Acknowledgements: The authors would like to thank X. Willmann and X. Vollmer (Precision Mechanics Group, Ophthalmologic Clinic, University of Tübingen) for the construction of the head-fixation system.

Support:

This work was supported by European Union FP7 HEALTH (Project LUPAS), Alzheimer's Association Grant IIRG-05-13464, and a PhD grant from the charitable Hertie Foundation (J.K.H.).

Abstract

To capture dynamic structural and functional changes in the brain, long-term in vivo imaging has become an indispensable tool. We describe a protocol for acquiring time-lapse imagery over weeks to months, beginning with surgical preparation, and then focusing particularly on a novel, fast and comprehensive 2-photon imaging approach to maximize repeatability and 3-dimensional registration. The use of a novel head-fixation apparatus eliminates rotational change, and thus the amount of data which must be discarded between imaging sessions. After detailing steps for surgery, design considerations of head-fixation are described, including the influence of rotation on previous protocols, followed by configuration steps for semi-automated re-imaging of the same volumes. These advances are critical for increasing throughput for repetitive and long-term measurement of in-vivo brain changes. After surgery and the initial imaging session, setup for repeated imaging can be done in under 10 minutes.

Introduction

In-vivo 2-photon imaging of the brain has led to increased understanding of many fundamental processes such as dendritic spine turnover¹, glia motility/activation², and neural activity³, to name a few examples. In studies of models of Alzheimer's disease-related pathology, this methodology has also produced substantial novel findings including β -amyloid plaque formation⁴, plaque-associated dendritic changes⁵. Our recent study⁶ imaged the same volumes over 6 months to show a slow and steady increase in β -amyloid plaque volume. Despite use by many laboratories world-wide over the last decade, there remain significant technical issues regarding the most appropriate surgical techniques, and the apparatus and protocols most appropriate for relocation and quantification of the same image volumes over time⁷. Here we will highlight the challenges and their impact on subsequent results, presenting a comprehensive protocol for accurate and reliable repeated imaging over time, including specifications for a novel head-fixation apparatus that essentially eliminates one potential source of interpretation error.

Repeated imaging of the same spatial location over time is an essential component of studying brain changes using multi-photon and other in-vivo imaging approaches. Until now, however, no methodical studies have addressed the sources of variation in positioning (i.e., translation and rotational error), and in many studies the apparent variation has not been corrected prior to analysis. To improve performance of existing protocols⁷⁻¹¹, and to further support new research topics, we have designed a protocol for optimized in vivo imaging which includes a novel head-fixation system. This method increases speed and accuracy in image acquisition, reduces the amount of data lost due to 3D rotation and incorrect alignment, and eliminates potential interpretation errors of earlier protocols.

The ability to precisely image the same region of interest with a time lapse between sessions has become increasingly important when researching pathological or physiological changes in in vivo multi-photon studies. All stages of the experimental design impact this process (surgery, head fixation, landmark registration, volume imaging, and image post-processing), and will be considered below.

In most previous protocols, the head fixation allows for rotation in all planes (see Box 1), and either does not control for rotation, or uses subjective and relatively imprecise visual inspection, as in our previous work which required post-processing registration for accurate comparison across time-points¹⁰. Two prior publications^{3, 12}, have provided novel solutions which address repositioning issues, but for reasons we will briefly discuss here, may not be the optimal solutions in terms of repositioning and other design considerations (see Box 1 for list). In order to limit the amount of movement during behavior, a fairly rigid fixation apparatus³ was designed which although stable, does not seem to control rotation around the Z-axis between imaging sessions, and tilt at the screw interfaces appears possible. It is unclear whether the authors intended this device for longer-term imaging protocols, or in investigation of brain changes which may interact with inflammation, as it also involves the fixation of a relatively large (20 mm) and heavy (1g) plate, which when installed, compresses the brain surface by 100-200 μm^3 . An implanted fixation device has been described in rats, which is screwed to the cranium¹². The authors describe one potential complication, the possibility of the attached screws penetrating the brain surface, and the four protruding extensions increase the risk of disturbance during normal activities in the home-cage (which may involve either/both

injury and positioning shifts). It is also unclear how practical this would be for use on the (much smaller) mouse.

Once the animal is fixed for imaging at the microscope, one approach to compensate for any positioning changes, is to mark relatively stable biological entities, such as blood vessels or labeled neurons, and to compute a new coordinate system for subsequent imaging. Although feasible, particularly when considering XY translation changes only, this solution suffers from precision limitations and if these external landmarks shift, all imaged locations will need to be corrected. The computation of the new locations is non-trivial in the case of significant rotation around other axes, and requires compensatory Z movements and/or scan rotation for imaging of subsequent XY fields. We thus recommend minimization of rotational changes, and the use of this coordinate system for the correction of XY positioning (e.g., to compensate for changes in stage origin between sessions).

Finally, image post-processing may be used for 3D co-registration, as we have successfully used previously¹⁰. However, this approach can be very inefficient in terms of image loss (Box 1), requiring sophisticated software, and rotational corrections may decrease overall resolution as XY resolution is always higher than resolution in Z. In addition, the demand for separate channels at each imaged location increases imaging time and the amount of energy absorbed by the tissue, furthermore it occupies a fluorescent channel which could be used to study additional structures.

Our novel head fixation system addresses the above issues, providing a way to fix the co-ordinate system on the first day of imaging. The rigid head fixation setup will not change during imaging periods and provides a convenient and stable 'bath' for objective immersion. This is done by attaching a relatively small titanium disc (14 mm outer diameter; 0.73 g) on the head of the mouse, which remains attached for the duration of the experiment. After the recovery period, the presence of this titanium ring has not resulted in any noticeable decrease in exploratory activity or lifespan (Supplement X, Video). The fixation system and associated imaging protocol greatly reduce the time necessary to reliably position the mouse for imaging and relocate a region of interest (ROI). Thus the laser time/absorption is shortened as well reducing the potential for laser-induced tissue damage and photo-bleaching.

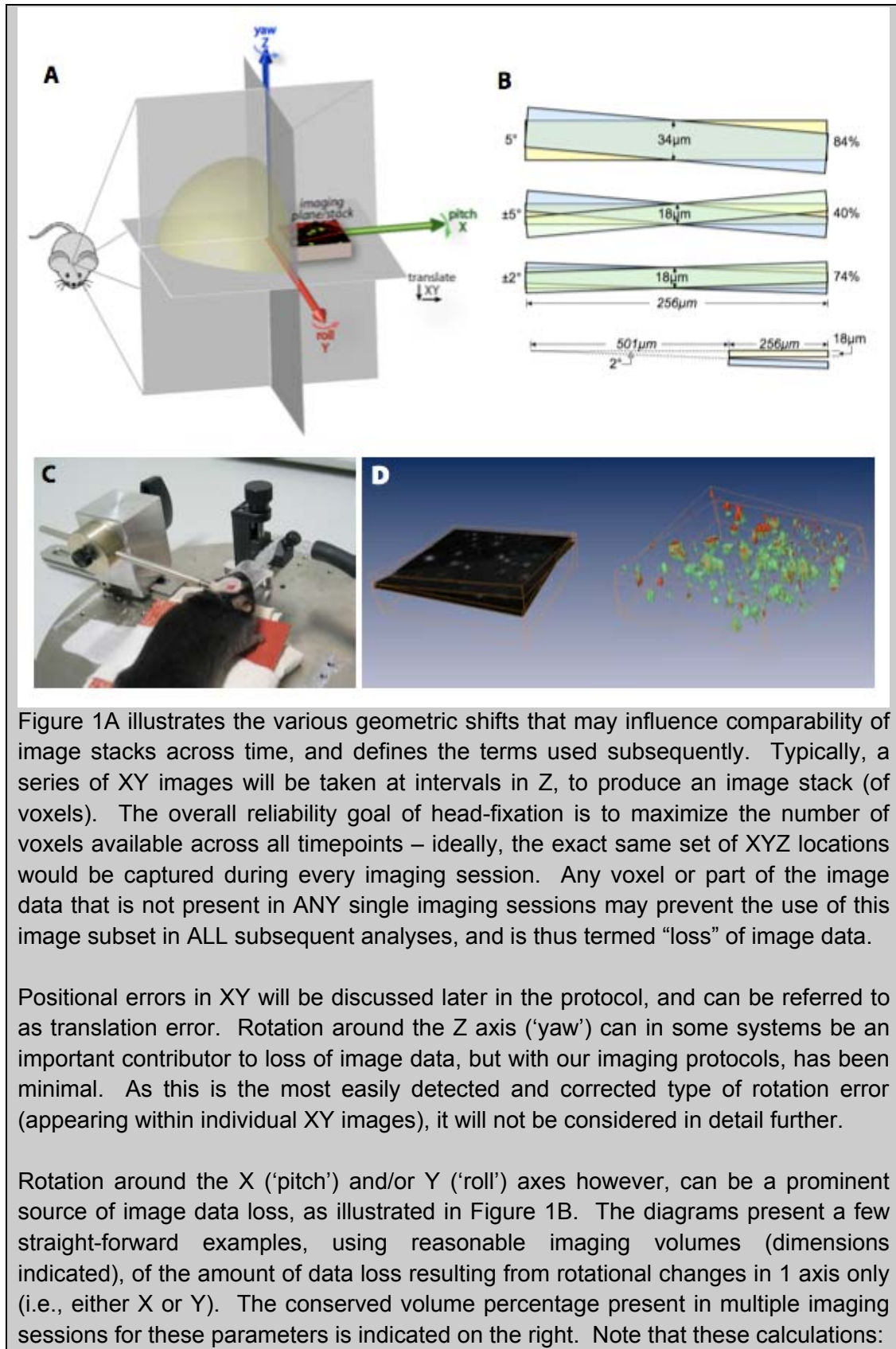
The surgical protocol integrated with this system evolved from our previous work¹⁰, which reaffirms that when certain technical details are carefully followed, no detectable alterations in inflammation are induced by installation of a cranial window⁶, even without the use of systemic treatments as has been previously described^{7, 9}. The practicality of this system has been shown during long term monitoring (over a period of 6 months) of β -amyloid plaque appearance and development⁶ (e.g., Fig. 3).

Box 1. Head fixation design considerations

The repeated high-resolution imaging of relatively small image volumes within the brain of a living animal has several technical challenges. A primary advance of the protocol described here is the development of a head-fixation system that increases efficiency, reduces the potential for interpretation error, and allows for the implementation of semi-automated acquisition. In this subsection, the need for and impact of this advance is discussed, in part, through the viewpoint of comparison to our earlier head-fixation system (Fig 1C). The specific design criteria for the apparatus include:

- 1) Small 'footprint': for mouse, minimize disruption of normal activity and the potential for injury/displacement through light weight and low/smooth profile.
- 2) Stability: not subject to vibration; does not move during imaging.
- 3) Flexibility: can be used by mice of different ages/weights, ideally also rats.
- 4) Speed of use: easy fixation/removal
- 5) Repeatability: minimize geometry changes

In this box, we will focus primarily on repeatability, ensuring that the same image locations can be reliably identified over time, and that the head fixation system is optimally-designed to reduce the loss of image data due to rotation.



- are only based upon change in 1 axis and common volume would decrease if rotation occurs in multiple axes simultaneously;
- necessitate use of the maximum rotational change between any two imaging timepoints (e.g., if 9/10 imaging sessions only differ by 1°, but the tenth by 5°, including the tenth session would require use of this larger angle's overlap); and
- model the change given the rotation is centered at the imaging stack (unlikely in practice).

In the more likely event the rotation angle is external to the imaged volume (bottom diagram in 1B), the extent of Z shift is dependent on the distance from this axis, which, given the dimensions in this example, would mean that even a relatively short distance of 0.5mm would result in zero overlap between stacks. In practice then, imaging of the same volumes has typically required manual re-centering of each imaged volume on an imaged feature (where the percent overlap/loss from the top 3 examples would then still apply).

Our earlier head-fixation design¹⁰ is shown in Fig 1C. This was designed for flexibility and was derived from the design of others in the field whereby the mouse is secured using a metal rod attached via a custom screw-receptacle (fashioned from dental cement at the time of surgery). Because the screw-thread is not precise and may wear over time, orientation of pitch was done visually before each imaging session. This angle typically varied $\pm 2^\circ$, and in a small subset of imaging sessions, by as much as 5° . Variation in roll was lower (with rotation angle at either/both where the rod was secured to the apparatus and/or at the screw receptacle), and was typically $< 1^\circ$ (although occasionally was also $\pm 2^\circ$).

To ensure measurement of consistent volumes with this approach, 3D registration (Figure 1D; Amira) was performed on the parallel imaging channel containing blood-vessels (imaged with Texas Red Dextran, as previously published¹⁰ and described below). All voxels that were not present in all imaging stacks were eliminated from all channels (or set to 0 depending on analysis type). The image on right (Figure 1D; Imaris) illustrates the impact inclusion of such voxels would have had on amyloid plaque measurements. The plaque surface from two imaging sessions is visualized (first session in green, second in red), with a substantial portion of individual plaques and plaque surface only present in one imaging session (e.g., red on top-left). The β -amyloid was visualized by injection of methoxy-X04 (see Supplement 2 for synthesis).

MATERIALS

REAGENTS

- *Experimental animals*: Transgenic mice expressing fluorescent proteins or expressing proteins which can be fluorescently labeled in vivo prior to imaging (e.g. hemizygous APPPS1 mice¹³ which co-express human APP_{KM670/671NL} and PS1_{L166P} both under the control of a Thy-1 promoter element¹⁴ were crossed with hemizygous Iba1-EGFP mice¹⁵. Both lines were generated on a C57BL/6 background.) **!CAUTION** Procedures relating to animal breeding and handling should adhere to the appropriate national and institutional regulations/guidelines.
- Fentanyl 0.05 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg, Medetomidin 0.50 mg/kg
- Flumazenil 0.5 mg/kg, Atipamezol 2.5 mg/kg
- Sterile PBS (BioWhittaker®)
- Softasept Skin disinfection (B. Braun®)
- Lubricant eye ointment (Bepanthen eye creme, Bayer®)
- iBond® glue self Etch (Heraeus®)
- Light curing Dental Cement (FlowLine, Heraeus®)
- 6-0 polyester suturing material (P-1 11mm3/8c, Mersilene®)
- Isoflurane
- Bottled oxygen
- Buprenorphine (Temgesic)
- Carprofen (Rimadyl)
- Sterile saline
- Methoxy-X04 (see Supplement 2 for synthesis)
- Texas Red (70,000 Da molecular weight)

EQUIPMENT

- Aero Duster 100 (Servisol®)
- Stereotactic Frame (Kopf® 2006)
- Metal bar attached to z-arm of stereotactic Frame (diameter 3mm, length 80mm)
- Absorbable Gelatin Sponge (Gelita-Spon®)
- Omnibrush (OmniDent®)

-
- Cotton-swab applicators
 - Superglue
 - Custom made cover slip 4mm diameter (Menzel[®])
 - Vmax Standard Micromotor System (NSK[®])
 - Push Button Contra Angle Handpiece (NSK[®])
 - Hardsteel or diamond head Burrs 0.8 mm diameter (Komet[®], H1SE204008)
 - Thermo Warming Pad (Thermopad[®])
 - Contura Type HS60 Razor (Wella[®] Professionals)
 - OPMI 1-FC Microscope (Zeiss[®])
 - Laboport-Pump (KNF Lab)
 - Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument (David Kopf Instruments)
 - High Powered Cordless LED Curing Light Radii-Cal (SDI)
 - Glass bead sterilizer
 - Surgical tools (forceps, scissors, bulldog clamps...)
 - IR camera (at least depicted in Figure2)

!CAUTION all surgical tools used must be sterilized prior to each surgery session.

▲ CRITICAL High-speed (e.g. 35000rpm) drilling with intermittent pauses to avoid heat build-up should be used. Slow drilling can result in uneven drilling and chipping of the skull.

- Head Fixation system: Custom-built fixation system for multiple replacement and imaging (Figure 2 and Supplementary data 1 for detailed specifications).
 - 2 aluminum block of 100 mm × 40 mm × 25 mm (A)
 - 2 aluminum block of 100 mm × 80 mm × 27 mm (B)
 - 2 aluminum cylinders of 182 mm in length and 60 mm diameter (uprights)
 - 1 aluminum block of 160 mm × 160 mm × 55 mm (support platform)
 - 1 aluminum plate of 228 mm × 40 mm × 2 mm (stable plate)
 - 1 aluminum plates of 65 mm × 15 mm × 2 mm (swivel plate)
 - 4 aluminum plates of 40 mm × 15 mm × 2 mm
 - 1 aluminum disc 5 mm diameter and 5 mm thick
 - 1 (or as desired) titanium disc 14 mm diameter and 2 mm thick (fixation ring)
 - 4 Grub screws 4 mm diameter and 10 mm long (C)

2 Steel screws 6 mm diameter and 25 mm long (D)

2 Steel screws 6 mm diameter and 30 mm long (E)

1 copper cylinder of 10 mm diameter and 40 mm long (clamping bolt)

Custom built fixation system: **!CAUTION:** Sizes may vary depending on the motorized stage and microscope used. Following the designs within the supplementary work attach A to the motorized stage using screws D. Connect the uprights to B using screws D. Slid B into A and fix with the grub screws (C). **!CAUTION:** Do not over tighten the screws as it will deform the aluminum of B which will in turn stop the ease of removal and replacement of this system. Place the support platform on both uprights ensuring the trough lies below the top of the uprights. Over this, place the stable plate (with connected swivel plate, brace plates and aluminum disc attached) and connect it to the support platform and uprights using screws E.

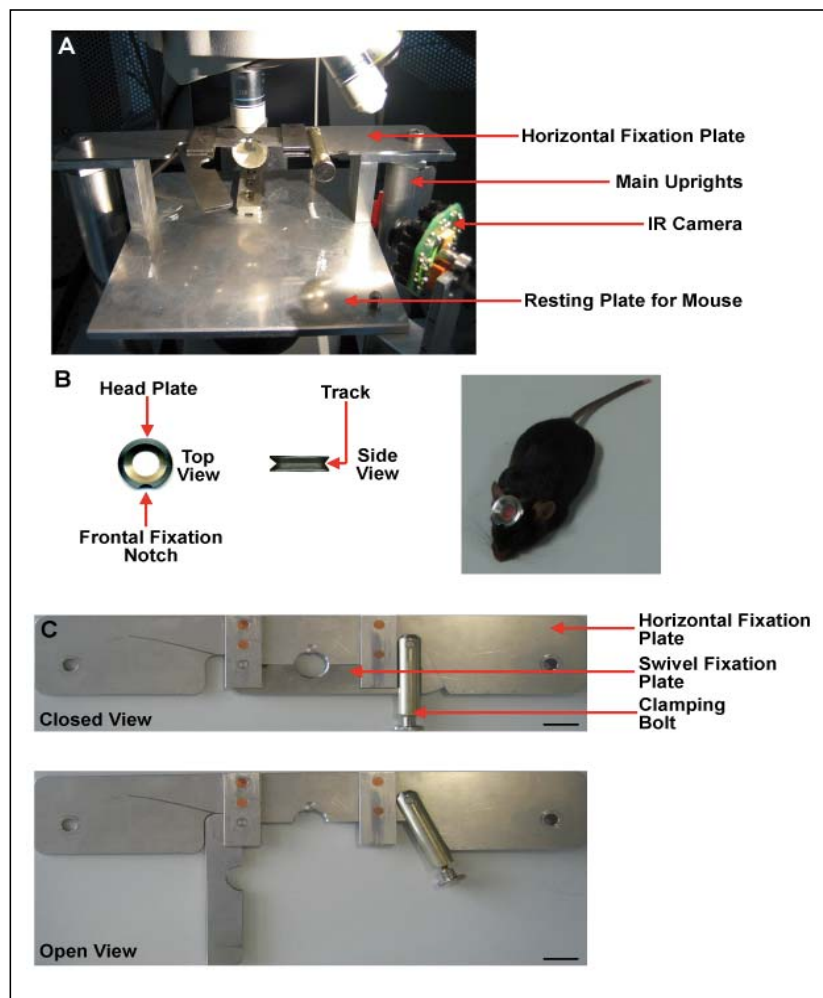


Figure 2. The head-fixation system, consisting of: (A) fully constructed fixation device under the microscope (B) head plate for fixation to the mouse, (C) and the main horizontal plate for fixation (open and closed view; scale bar=15 mm). The construction can be done with standard metalshop equipment (lathe/milling/saw), and reasonable time/material expenditures (our shop estimates 20 hours and 50 euros for raw materials).

- Microscope: We use a Leica DMLFS microscope attached to a Spectra Physics (San Jose, California) Mai-Tai laser, which provided multiphoton excitation from 710nm to 990nm. Detection was done with two non-descanned PMT detectors located to the right and within close proximity of the objective, after filtering: BP 525/50 for methoxy-X04, BP 515/30 for GFP, and BP 590/60 for Texas Red.
- The head fixation system was mounted on a motorized X-Y stage, with parts from the integrated in-vivo bridge (380FM-2P; Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) removed to accommodate the new system. The software was provided by Leica and integrated with the stage and its controller.
- Objective: The objective used was a 40x water immersion lens with a 0.8 numerical aperture U-V-10/D (Leica Microsystems, Bensheim, Germany).
- Low-power objective for alignment (described in protocol below).

REAGENTS SETUP

- Anesthesia: Fentanyl 0.05 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg, Medetomidin 0.50 mg/kg
- Antidote: Flumazenil 0.5mg/kg, Atipamezol 2.5mg/kg
- Methoxy-X04, 10mg/ml
- TexasRed[®], Invitrogen[®], 12,5mg/ml in sterile PBS
- Temgesic, Rimadyl composition/dilution

PROCEDURE

Cranial Window preparation ● **TIMING 45-60 min**

1| Weigh the mouse to determine the appropriate amount of anesthesia by intraperitoneal injection (Fentanyl 0.05 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg, Medetomidin

0.50 mg/kg). Wait for 10-15 min. Place the animal on a warming pad to maintain a body temperature of ~37°C.

2| Shave the hair over the complete scalp down to the neck with a small rodent razor. Remove all the remaining hair fragments with pressurized air. Clean the surgical field with a skin disinfectant.

▲CRITICAL STEP: closely monitor the depth of anesthesia during the complete procedure by testing the animals reflexes (e.g. pinching the animal's foot with a blunt pair of forceps). Inject $\frac{1}{4}$ of the amount of anesthesia previously used if necessary.

3| Securely fix the mouse in the stereotactic frame and lubricate both eyes with a drop of eye ointment to prevent them from drying out.

!CAUTION: Dried out eye tissue can cause permanent damage to the eyes. Also make sure that the mouse is fixed securely into the stereotactic frame. Drilling on an unfixed skull can result in uncontrolled movement of the head.

4| Perform a midline scalp incision extending from the neck region to the front of the head between the eyes. Fix the skin with four bulldog clamps, two at the back of the neck and two at the front of the head, to completely expose the surgical field.

5| Remove the periosteum using cotton swabs and subsequently scrape off any remains with a surgical blade. Scratch several lines across the complete skull to get an optimal connection between the glue and the skull bone. Local anesthesia can be added to the skull surface to minimize pain.

! CAUTION If local anesthetics are used, it is important to examine the effect of anesthetics on the underlying tissue as it may influence the results of experiments (e.g., spine and filopodia dynamics).

▲CRITICAL STEP: Make sure to completely remove the periosteum from the exposed surface, as remaining parts can loosen from the skull and affect the stability of the glue.

5| Apply the iBond[®] glue onto the complete skull and distribute it with an omnibrush for 20 seconds. Gently dry the glue with pressurized air. As iBond[®] glue is light curing, use the blue light Radii-Cal for 40 seconds.

▲OPTIONAL STEP: in order to enhance stability of the window one can carefully detach the facial muscles on both sides of the skull. The exposed bone rim can then also be covered with iBond® glue and dental cement.

6| Use a custom made cover slip of 4 mm diameter to cover the area to be imaged. Gently carve a fine line around the cover slip with surgical forceps to ensure that the craniotomy has the correct size. (Fig. 3A)

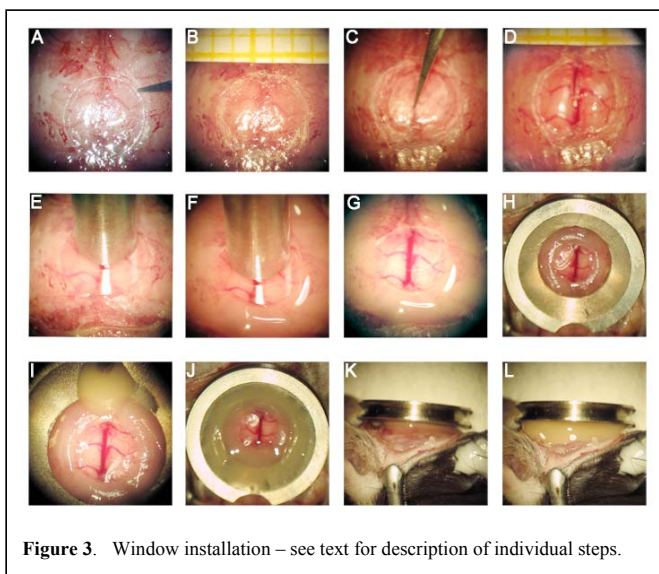


Figure 3. Window installation – see text for description of individual steps.

7| The skull consists of 3 layers, two layers of compact bone around a layer of thicker spongy bone. The spongy bone contains small cavities as well as blood vessels within canaliculi. Remove the first compact layer and the majority of the spongy bone with the drill. Minor bleeding may occur while drilling

through the spongy bone layer. Remove the accumulating bone dust with pressurized air.

▲ CRITICAL STEP: Depending on the age of the mouse, the skull thickness varies. Only use light pressure when drilling as this could result in chipping or breaking of the skull. Gently remove the bone layers by steady movement of the burr.

8| Drill until the vasculature is clearly visible through the skull (Fig. B). Examine the drilling process during the entire procedure with the dissecting microscope. Stop drilling when there is visible movement of the bone with a light touch of the middle of the craniotomy (Fig. C).

9| Clean the surgery site with sterile PBS to remove all bone dust before removing the skull. Use a suction pump to remove the PBS containing the bone dust.

10| Put a drop of PBS onto the surgical field. Use sterile angled forceps to puncture the skull at a location where there are no vessels visible in the drilled notch. The PBS should flow under the skull separating the dura mater from the skull. Wait for 5-10 minutes.

▲ CRITICAL STEP: Take great care not to puncture the brain or the dura mater while puncturing the skull as this may result in bleeding, activation of microglia cells and/or subsequent thickening of the dura mater, all of which may obscure the window and greatly affect the imaging quality, and potentially also alter the experimental results.

11| Use angled forceps to remove the skull from the punctured position. If bleeding occurs use wet absorbable gelita-spon® to stop the bleeding. Bleeding locations can be made visible by first flushing the surgical field with sterile PBS.

!CAUTION: Make sure that the brain stays moist at all times. Local dehydration of the brain can cause brain injuries or alter the results of the experiments.

12| Put a drop of sterile PBS onto the exposed dura mater (Fig. 3D). Put the custom made sterile cover slip onto the dura mater and push it down gently until it is flush with the skull by use of a metal bar fixed to the z-arm of the stereotactic frame (Fig. 3E).

13| Completely dry the surrounding bone with pressurized air and cotton swabs to ensure that the dental cement will properly adhere the cover slip to the skull. Additional fine lines can be carved into the skull with a surgical blade to strengthen the adhesion.

!CAUTION: Make sure that the PBS under the cover slip is not removed during the process of drying the surrounding bone. Air bubbles under the cover slip can result in thickening of the dura mater, which will obscure the window.

14| Use the dental cement to fix the lower part of the cover slip to the skull and cure it for 40 seconds (Fig 3F). Then lift the metal bar to secure the rostral part of the cover slip with dental cement and cure. Evenly distribute the dental cement generously over the surrounding skull to ensure window fixation (Fig. 3G).

▲ CRITICAL STEP: When lifting the metal bar from the window observe closely if the cover slip moves. If this is the case, the glue on the lower part of the cover slip is either not cured completely or did not make good contact with the bone structure and has to be replaced.

15| The custom made fixation ring is now placed over the cranial window (Fig. H). Glue the fixation ring onto the skull surface with superglue. The small carvings on the inner surface of the ring help the dental cement to form a connection between the ring and the existing layer of dental cement (Fig. 3I). Completely fix the titanium ring over the craniotomy with dental cement by connecting the inner (Fig. 3J) and outer (Fig. 3K,L) surfaces of the ring with the underlying layer of dental cement.

▲ CRITICAL STEP: Make sure that each layer of dental cement is fully cured before proceeding to the next layer. Instable layers of cement influence the integrity of the system.

!CAUTION: Ensure no dental cement gets lodged into the track of the fixation ring. It will prevent the ring from sliding into the fixation system.

16| Take the mouse out of the stereotactic frame. Use a sterile surgical scissor to remove protruding parts of the skin. Remove the bulldog clamps from the head and neck. Perform 2-3 interrupted sutures at the front of the head and the neck until the skin surrounding the fixation ring is completely closed.

17| Administer appropriate amount (equal to amount of anesthesia) of antidote and analgesia (e.g. Temgesic[®], Rimadyl[®]) by intraperitoneal injection. Monitor the mouse until it is completely awake again. After the mouse is fully mobile again return it to its housing cage.

!CAUTION: A recovery period of 4-5 days is recommended before imaging to ensure that the surgery was successful. If the surgery was not performed correctly it can lead to bleedings or thickening of the dura mater, which will be visible during the first week after surgery.

!CAUTION: Do not lower the objective against the titanium ring nor the cranial window, this will scratch the lens or damage the window.

? TROUBLESHOOTING

24 | Once the surface of the cortex has been located, switch to the higher-magnification objective (e.g., ×40 water). Taking care not to scratch the objective lens, fill the fixation ring with ddH₂O until the objective lens is immersed. Using low laser intensity and the microscope software, locate a region of interest (ROI).

25 | Once the ROI has been identified take note of the top and bottom of the volume that you wish to image. Using the Leica "Mark & Find" function (or similar), save the position of the ROI. Following this, set the desired top and bottom of the ROI and the slice thickness (z-step size). Save this file. This will now be referred to as position one. For extra positions, simply repeat this step for each newly identified ROI.

▲ CRITICAL STEP: Remember to save this parameter file, as it will be used for the next imaging session.

!CAUTION: Although this protocol is based upon elimination of such contingencies, changes between image volumes and initial coordinates can occur, and it may be useful for validation to use the objects under study (e.g., β-amyloid plaques) or include additional channels (e.g. blood vessels, labeled neurons) for 3D registration based upon biological entities.

? TROUBLESHOOTING

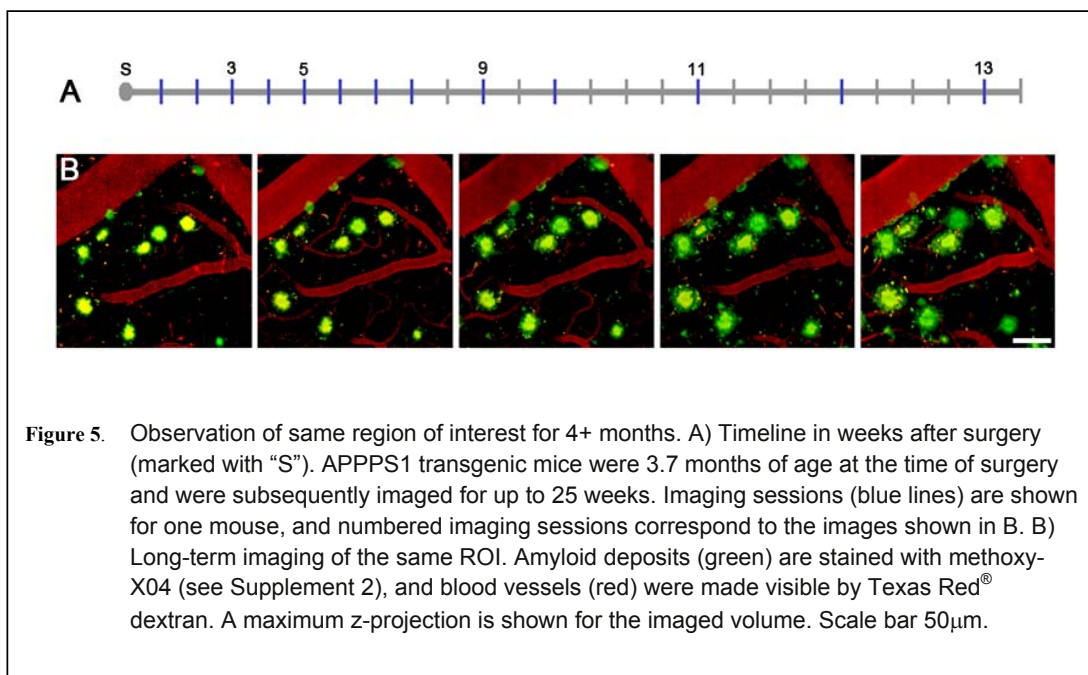
26 | At this point a list of desired image volumes with corresponding XYZ resolution have been recorded. To image, simply run the "series scan" function (for Leica software users). This function will image all positions that were saved in the last step with the desired top, bottom and slice thickness that was set. The same stack can be imaged multiple times using the time-lapse mode provided in the Leica software (or similar).

Multiple imaging sessions ● **TIMING** 15min – several hours

27 | For multiple imaging sessions of the same target locations, load the parameter file with the marked position and select the first position. Open the image from the first day of imaging as a reference. Using a low laser intensity and the microscope software proceed to verify the position using a stable biological entity that was selected on the first imaging session (or other zero coordinate, see Box 2). Multiple positions can be imaged subsequently with fixed time intervals by use of the time-lapse mode provided in the Leica Software (or similar).

▲ **CRITICAL STEP:** If the positions have moved due to biological factors, save the new position for use as a starting point for the next imaging session.

? TROUBLESHOOTING



28 | Once the position has be verified repeat step **26**

● TIMING

Steps 1-17, Cranial window preparation: 45-60 min

Steps 18-21, Preparation prior to imaging: 10-15 min

Steps 22-26, Imaging: 15-30 min

Steps 27-28, Multiple imaging sessions: 15 min-several hours

? TROUBLESHOOTING

Trouble shooting recommendation can be found in **Table 1**.

Box 3, Error in target relocation

The head fixation system was tested to measure shifts in target localization. This was done to evaluate three potential levels of spatial shift. The first source would be error from the **fixation system** itself, due to removal and replacement of the sample under the microscope. Using a fixed tissue sample on a cover slip with a fixation ring attached, 3 positions were imaged. The sample was then removed and replaced for reimaging. This was repeated three times. The co-ordinate shift from removal and replacement (fixation system error alone) was $1.67 \pm 0.32 \mu\text{m}$ and $1.03 \pm 0.72 \mu\text{m}$ in x and y respectively. As for the z coordinate, no measureable change was found (i.e., $< 1 \mu\text{m}$).

Next, the error from **reinitialization** was investigated, which occurs during software/hardware startup (stage (Luigs & Neumann), and objective (Leica) motor charging and origin finding routines). Leaving the fixed sample in the fixation system, the stage, stage controller, microscope hardware and software were powered down and restarted. Following each reinitialization, a 3D image stack was taken. The shift due to this procedure was $0.44 \pm 0.22 \mu\text{m}$, $0.37 \pm 0.10 \mu\text{m}$ and $2.23 \pm 4.33 \mu\text{m}$ for the x, y and z coordinates respectively, and is comparable to vendor-verified specifications.

Finally, spatial shift during **in vivo imaging** was investigated. Two mice were imaged for this experiment. We carried out 4 imaging sessions in 4 regions per mouse with 2 day session separation using marked blood vessels as rigid biological references. The four positions were marked and saved as described in step #25. $300 \times 300 \times 50 \mu\text{m}$ stacks were imaged with a step size, in z, of $2.1 \mu\text{m}$ for each position. A total of 24 image stacks were used to determine the shift in the x, y and z co-ordinates. The overall shift was found to be $15.24 \pm 10.76 \mu\text{m}$, $5.79 \pm 11.21 \mu\text{m}$ and $5.06 \pm 8.71 \mu\text{m}$ respectively.

Taken together for these experiments, with all contributing factors to changes in image geometry over many imaging sessions, the conserved volume was 77.4% \pm 8.6% (image volumes: $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$). Based upon the above factor analysis, the majority of this change was due to biological shifts in position between origin and target coordinates. No measureable changes were found in rotation around any axis for any of the above steps.

!CAUTION: Errors from stage movement, and particularly reinitialization, can differ depending on the equipment used (e.g. stage and microscope). It is best to consult the manufacturer's specifications for the equipment accuracy. For in vivo imaging, biological changes occur, and are important contributing factors for spatial shift.

ANTICIPATED RESULTS

When imaging in vivo over time, relocating the targets imaged in previous imaging sessions is essential. Figure 5 shows an example of this application - the same tissue volume containing β -amyloid plaques imaged over a period of 4+ months. There may be however, a shift in target location due to biological changes depending on the type and length of the intended experiment (over days or months, see Box 3). The saved coordinates based on the fixation system should thus be verified and adjusted before automated imaging is conducted.

Concluding Remarks

It is beyond the scope and intention of this paper to evaluate the impact uncontrolled geometric changes have had on the conclusions of previous papers, the potential for misinterpretation clearly exists however, and thus unless this or a head fixation protocol exhibiting similar properties is used, the application of the principles discussed for 3D registration should be applied. In addition to the increase of efficiency from reuse of a larger percentage of the imaged volumes, the use of this protocol and novel head fixation system provides for much faster preparation time, and previously imaged targets can be scanned sequentially with minimal supervision. Reducing the overall imaging time is also beneficial in lowering the amount of energy absorbed by the tissue, and thus decreasing the likelihood of phototoxicity and bleaching. It should also be noted that although this protocol recommends a cranial window, the head fixation system has also been tested and proven to work for thinned skull imaging. Taken together, the presented protocol and head fixation system should improve both accuracy and efficiency for in vivo imaging, with applicability across disciplines and imaging modalities.

Table 1| Troubleshooting Table

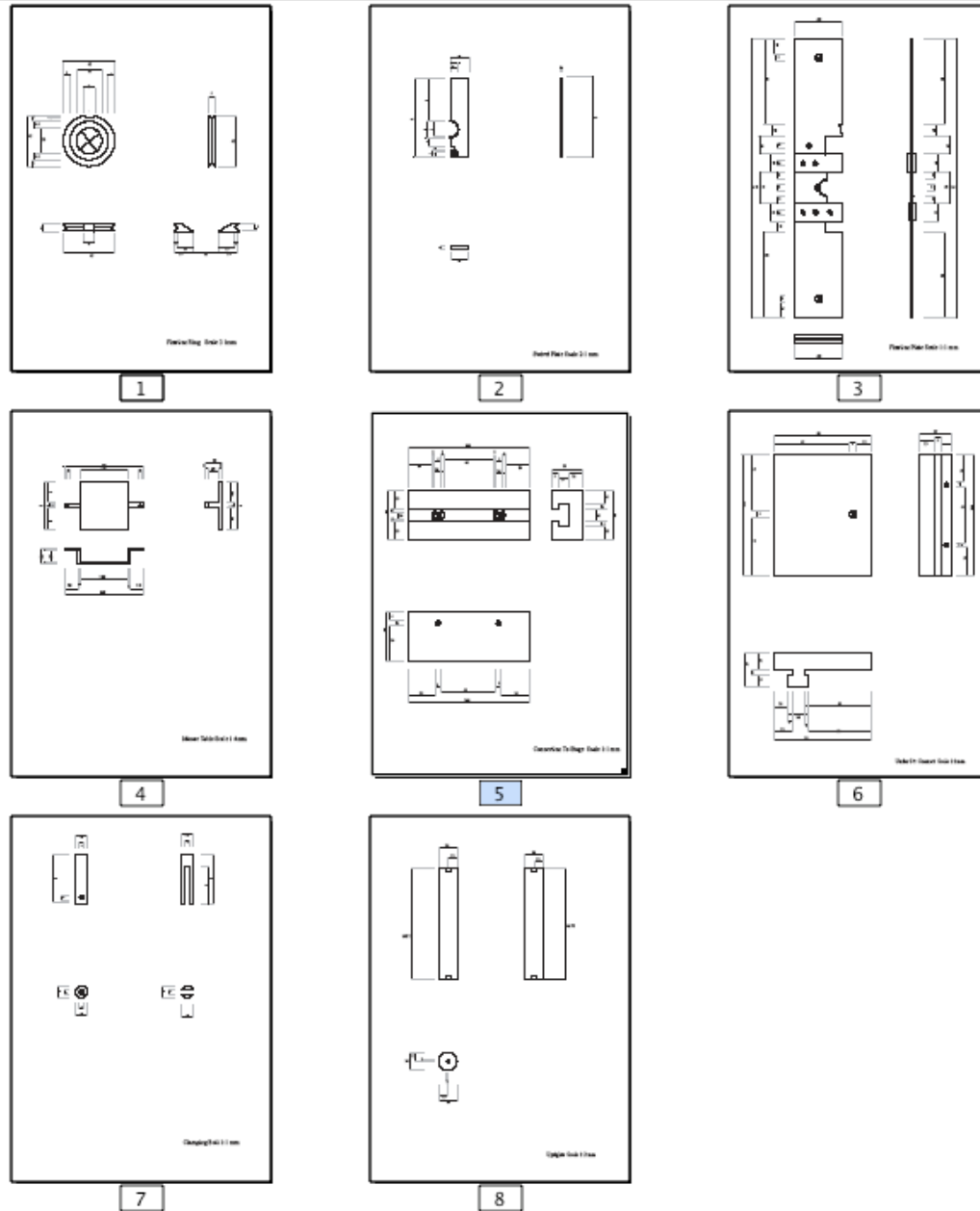
Step	Problem	Possible Reason	Solution
21	Hair is caught	Inadequate trimming	During the surgery and before imaging, trim the excess hair away from the fixation ring. When closing the fixation system use a pair of fine-tipped forceps to push the hair down.
5,23	Poor visibility (ambient)	Limited light for initial landmarks	Use an external lamp to shine light into this region. Remember to remove the lamp afterwards so it does not interfere with the stage when it moves automatically
27	Poor visibility (2p)	Thickening of dura mater	If damaged during surgery, the dura mater can thicken and cause poor visibility. In this case the dura can only be removed, or this subject excluded as the window cannot be used otherwise.
		Unclean window	Clean the window with a cotton swab or omnibrush gently with sterile water. Make sure not to use any pressure while cleaning.
	Can't find saved position again	Bleeding	If there is blood visible under the window it is advisable to wait for several days as the window may become clear again.

		Stage was not initialized	Initialize the stage to be able to find the same coordinates again.
		Something is caught in the swivel plate	Clean the head fixation system from anything that is caught in addition to the fixation ring.
		Landmarks moved (e.g. blood vessels)	Visually inspect surrounding area to identify the landmarks.

References

1. Grutzendler, J., Kasthuri, N. & Gan, W. B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812-6 (2002).
2. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-8 (2005).
3. Dombeck, D. A., Khabbazi, A. N., Collman, F., Adelman, T. L. & Tank, D. W. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43-57 (2007).
4. Dong, J., Revilla-Sanchez, R., Moss, S. & Haydon, P. G. Multiphoton in vivo imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 59, 268-75 (2010).
5. Tsai, J., Grutzendler, J., Duff, K. & Gan, W. B. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7, 1181-3 (2004).
6. Hefendehl, J. K. et al. Long-term in vivo imaging of beta-amyloid plaque appearance and growth in a mouse model of cerebral beta-amyloidosis. *J Neurosci* 31, 624-9 (2010).
7. Holtmaat, A. et al. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc* 4, 1128-44 (2009).
8. Spires-Jones, T. L., Calignon, A. D., Meyer-Luehmann, M., Bacskai, B. J. & Hyman, B. T. Monitoring protein aggregation and toxicity in Alzheimer's disease mouse models using in vivo imaging. *Methods Epub* (2010).
9. Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W. B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* 5, 201-8 (2010).
10. Bolmont, T. et al. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 28, 4283-92 (2008).
11. Meyer-Luehmann, M. et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720-4 (2008).
12. Hadlock, T., Kowaleski, J., Mackinnon, S. & Heaton, J. T. A novel method of head fixation for the study of rodent facial function. *Exp Neurol* 205, 279-82 (2007).
13. Radde, R. et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7, 940-6 (2006).
14. Andra, K. et al. Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol Aging* 17, 183-90 (1996).
15. Hirasawa, T. et al. Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81, 357-62 (2005).

Supplemental Information 1: Engineering drawings for head fixation apparatus



Supplemental Information 2: Synthesis of Methoxy-X04

Synthesis of 2-methoxybenzene-1,4-dioic acid:

2,5 dimethylanisole (7.00 g, 46.0 mmol) was dissolved in hot water (700 ml). KMnO_4 (25.46 g, 161.0 mmol) was added in small portions over 1 h at 100°C to the vigorously stirred solution. The reaction mixture was stirred over night at 100°C . The precipitated MnO_2 was filtered off from the hot solution and washed twice with boiling water. The combined filtrates were acidified with concentrated hydrochloric acid and cooled to 7°C . The precipitated diacid was filtered off after 20 h (6.10 g, 63%), mp = 274.4°C ; ^1H NMR: (500 MHz, DMSO) δ = 7.69 (d, 4J = 7.8 Hz, 1H), 7.60-7.53 (m, 2H), 3.87 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ = 166.6, 166.3, 157.2, 134.2, 130.0, 125.4, 120.6, 112.2, 55.5 ppm.

Synthesis of dimethyl 2-methoxyterephthalate

2-methoxybenzene-1, 4-dioic acid (6.00 g, 28.3 mmol) was dissolved in methanol (80 mL), cooled to 0°C and SOCl_2 was added dropwise under vigorous stirring. The reaction mixture was consecutively stirred for 30 min at 0°C , 2 h at RT and finally heated to reflux for 1 h. K_2CO_3 (2.99 g, 28.3 mmol) and Na_2CO_3 (3.90 g, 28.3 mmol) were added to the reaction mixture which was heated to reflux for 3 h. The reaction mixture was cooled to RT, quenched with ice cold water and extracted with dichloromethane. The combined organic phases were consecutively washed with 2N NaOH_{aq} and brine (three times each), dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated in vacuum to provide 5.30 g (92%) of dimethyl 2-methoxyterephthalate as colorless solid.

^1H NMR: (300 MHz, DMSO) δ = 7.73 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.8 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ = 165.3, 165.0, 157.3, 133.3, 130.4, 124.2, 120.5, 112.1, 55.6, 52.2, 51.9 ppm; MS (m/z, 70eV, EI) = 225 (M^+), 193, 180, 149.

Synthesis of (2-methoxy-1,4-phenylene)-dimethanol

Dimethyl 2-methoxyterephthalate (5.30 g, 23.6 mmol in 25 mL dry tetrahydrofuran) was added dropwise to a stirred suspension of LiAlH_4 (5.40 g, 141.9 mmol) in abs. THF (15 mL). The reaction mixture was heated to reflux for 1 h then cooled to RT. To the suspension were added slowly 6 mL of water, then 12 mL of 10 % NaOH_{aq} and again 24 mL of water: The suspension was stirred for 1 h. The aluminum salts were filtered off using a pressed plug of Celite. The combined filtrates were acidified with 2N H_2SO_4 , extracted with ethylacetate five times. The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuo to provide 3.4 g (75%) of the (2-methoxy-1, 4-phenylene) dimethanol.

^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.18 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H), 6.86-6.81 (m, 2H), 4.71-4.52 (m, 4H), 3.81 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 157.5, 142.2, 128.6, 128.2, 118.8, 108.9, 65.0, 55.3 ppm; MS (m/z , 70eV, EI) = 219 (M^+ + Na).

Synthesis of tetraethyl (2-methoxy-1,4-phenylene)bis(methylene)diphosphonate

(2-methoxy-1, 4-phenylene) dimethanol (3.4 g, 15.5 mmol) was suspended in dichloromethane and SOCl_2 (3.05 mL, 43.4 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at RT over night. The reaction mixture was filtered over silica, washed with DCM twice and the solvent was removed under vacuum. The resulting dichloride was dissolved in triethylphosphite (20 mL) and stirred 16 h at 140°C . The excess of triethylphosphite was removed via distillation at 2 mbar at 150°C to provide 5.43 g (86%) of tetraethyl (2-methoxy-1,4 -phenylene)bis(methylene)diphosphonate as clear oil, slowly crystallizing as colorless solid.

^1H NMR: (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.22 (dd, 3J = 7.6 Hz, 4J = 2.7 Hz, 1H), 6.83-6.79 (m, 2H), 4.06-3.93 (m, 8H), 3.81 (s, 3H), 3.22 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 3.15 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 3.13 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 3.06 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 1.24-1.18 (m, 12H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 157.2, 131.7, 131.1, 121.9, 112.9, 62.1, 55.5, 33.8 (d, J = 136.7 Hz), 26.4 (d, J = 137.8 Hz), 16.3 ppm; MS (m/z , 70eV, EI) = 408 (M^+ + Na), 271.

Synthesis of 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-methoxy-1,4-phenylene)bis(ethene-2,1-diyl)diphenol (Methoxy-XO4):

An oven-dried (140°C , 24 h) 2.5 mL Wheaton-vial was charged with KOTBu (430.5 mg; 0.83 mmol), dry DMF (1 mL), and tetraethyl (2-methoxy-1,4-phenylene)bis(methylene)diphosphonate (200 mg, 0.48 mmol) dissolved in 0.5 mL DMF. The mixture was stirred at RT for 30 min. The 4-hydroxybenzaldehyde (101.6 mg, 0.83 mmol dissolved in 0.5 mL dry DMF) was added dropwise to the suspension, a colour change from dark-red to a greenish yellow fluorescence was observed. The reaction mixture was stirred at RT over night. The reaction mixture was transferred with 20 mL of 1N hydrochloric acid to an extraction funnel and extracted with ethyl acetate (3x 50 mL). The combined organic phases were consecutively washed with 1N hydrochloric acid, brine, dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate; 2/1) to yield 100 mg (60%) of Methoxy-XO4 as yellow solid.

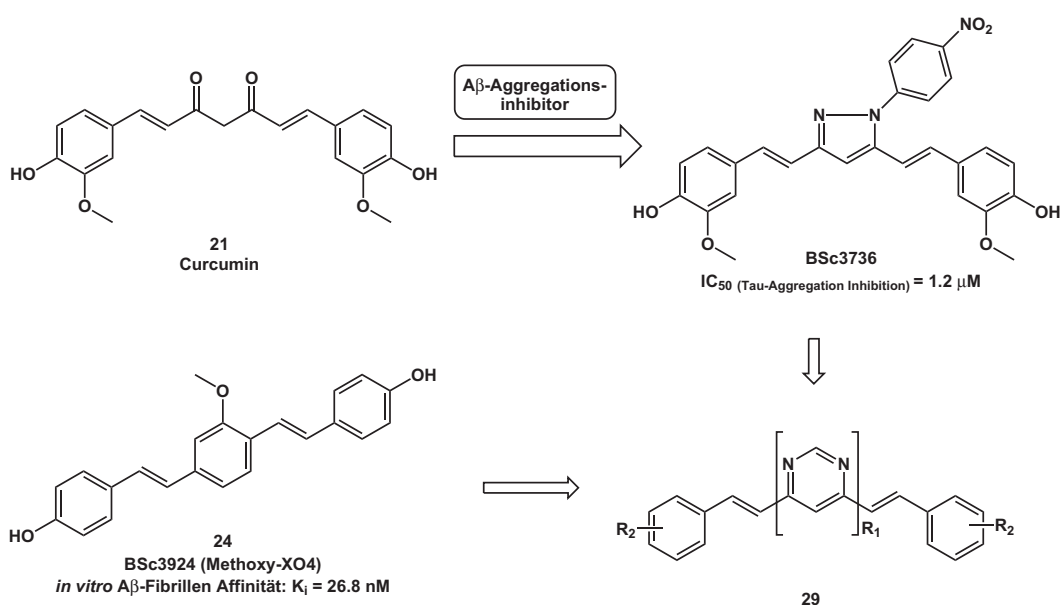
^1H -NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 7.57 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H), 7.42 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 7.37 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, $^3J/^3J_6$ = 16.5 Hz, 2H), 7.17 (d, 4J = 1.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, 4J = 1.5 Hz, 3J = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (d, 3J = 16.5 Hz, 1H), 7.00 (d, 3J = 16.5 Hz, 1H), 6.77 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 6.76 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (DMSO, 75 MHz): δ = 157.2, 157.1, 156.3, 137.6, 128.6, 128.2, 127.8, 127.6, 125.8, 125.0, 124.8, 119.3, 118.8, 115.5, 108.5, 55.4 ppm; MS (EI, 70 eV): m/z = 344 (M^+); Abs. (methanol) I_{max} = 450 nm; Em. (methanol) I_{max} = 380 nm.

3.5 Fluoreszenzdiagnostik für die Alzheimer-Demenz

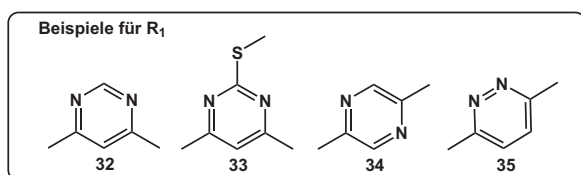
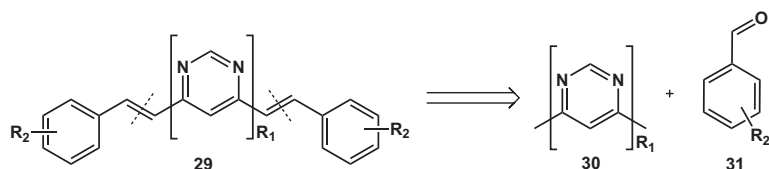
Die sichere, preiswerte und verlässliche Diagnose von Alzheimer-Demenz ist, wie in der Einleitung geschildert mit den zurzeit klinisch etablierten Methoden nur bedingt möglich. Verfahren, die eine Differenzialdiagnose unterstützen, wie etwa CT, PET und SPECT, sind teuer und nur eingeschränkt verfügbar. Die dabei derzeit verwendeten Markierungssubstanzen sind teilweise nicht ausreichend spezifisch hinsichtlich selektiver und unselektiver Bindung. Auch entsprechende Vorsorge- und Früherkennungsmaßnahmen sind mit den derzeitigen Markern und Verfahren nicht möglich, da sie die pathologischen Veränderungen erst zu einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium detektieren können.^[47, 55-60, 99] Die Suche nach neuen Substanzen mit hoher Affinität und Selektivität zu den pathologischen Ablagerungen der AD, den A β - und Tau-Proteinen, ist also ein wichtiges Ziel ebenso wie die Entwicklung weitere Diagnoseverfahren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden speziell aus der bis dahin für die Diagnostik der Alzheimer-Demenz wenig bekannten Gruppe der Divinylpyridazine (**29**) hoch affine, selektive und stark fluoreszierende Marker synthetisiert. Die Motivation diese Substanzklasse für die AD-Diagnostik zu untersuchen basierte zum einen auf ihren bereits bekannten sehr guten Fluoreszenzeigenschaften.^[100a,b] Zum anderen auf der strukturellen Verwandtschaft zu Methoxy-XO4 (**24**; BSc3924) und Curcuminderivaten, die als dualer A β - und Tau-Aggregationsinhibitor bekannte gute Affinität zum Target zeigen (Schema 03).^[101]



Schema 03: Motivation für die Strukturklasse der Divinylpyridazine (**28**).

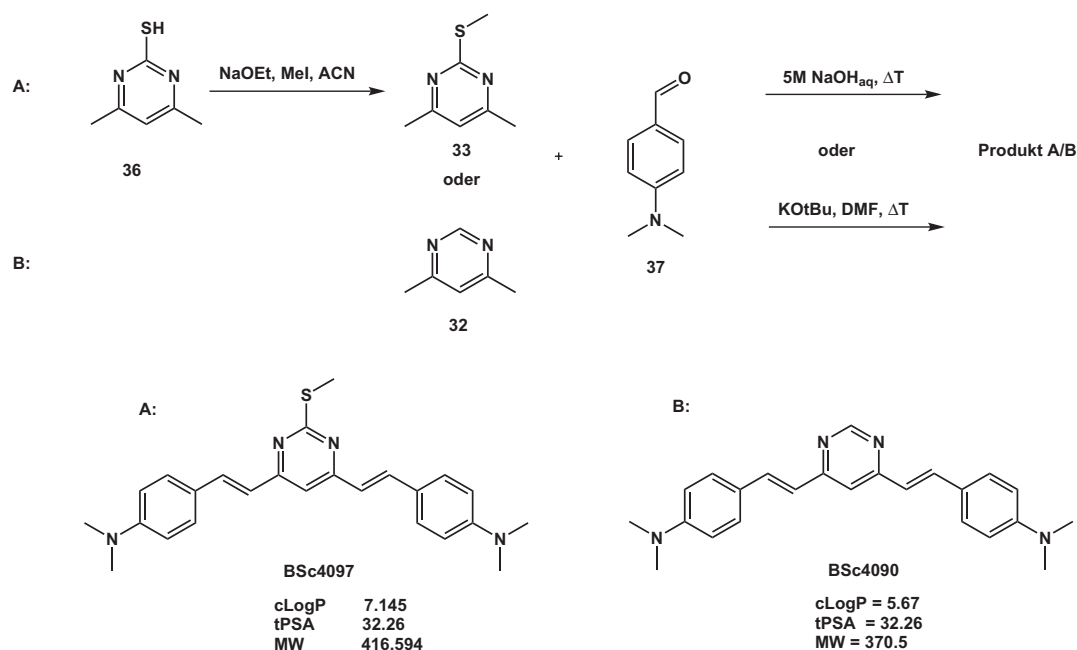
Eine retrosynthetische Betrachtung des Divinylpyridazins (**29**) führt, durch Trennung an der Doppelbindung, zu den beiden dargestellten Vorläufern, einem Dimethylpyridazin (**30**) und einem entsprechenden aromatischen Aldehyd (**31**) (**Schema 04**).



R_2 = (substituierter) aromatischer Aldehyd

Schema 04: Retrosynthetische Betrachtung für die Darstellung von Divinylpyridazinfarbstoffen (**28**).

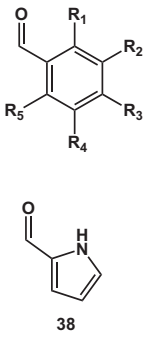
Für den Dimethylpyridazinmittelteil (**30**) sind verschiedene Substitutionsmuster denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit standen die auf **32** und **33** basierenden Derivate wegen ihrer erwähnten Analogie zu den von Curcumin abgeleiteten Substanzen im Vordergrund (**Schema 05**).



Schema 05: Synthese der Dimethylpyridazin basierenden Marker **BSc4097** und **BSc4090**.

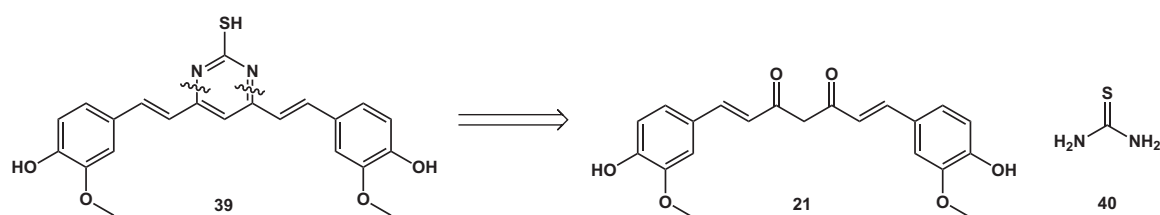
Die Synthese dieser Derivate gelang über eine basenkatalysierte azaanaloge Aldolkondensationsreaktion aus den entsprechenden Dimethylpyridazinen (**32/33**) durch Umsetzung mit aromatischen Aldehyden (**31/37**) (**Schema 04/05**).^[100a, 102]

Die Reaktion konnte sowohl in Wasser mit Natriumhydroxid, als auch in Dimethylsulfoxid mit Kalium-*tert*-butanolat als Base durchgeführt werden. Die Ausbeuten schwankten dabei, in Abhängigkeit des verwendeten Aldehydes, über einen großen Bereich von sehr guten (>90%) bis sehr schlechten (< 30%). Dabei war oft die Isolation des Produktes von den nicht genauer untersuchten Nebenprodukten problematisch, was die schlechten Ausbeuten begründet. Bei einigen Aldehyden konnte auch keine Reaktion festgestellt werden. Es handelte sich dabei überwiegend um mit freien Hydroxylgruppen substituierte aromatische Aldehyde (**Tab. 02**). Dazu gehörten auch Aldehyde mit nicht abgesättigtem Stickstoff (z.B. **38**) die ebenfalls nicht umgesetzt werden konnten.

	Substituent Aldehyd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
		H	H	H	H	H
		F	H	Br	H	H
		H	H	OH	H	H
		H	OCH ₃	OH	H	H
		OH	OH	OH	H	H
		CH ₂ OH	H	C-R ₃ =N	CH ₃	OH
		H	Br	OH	Br	H
		H	H	COOH	H	H

Tab. 02: Übersicht über die Aldehyde die sich nicht über die aldoanaloge Reaktion mit den Dimethylpyrimidinen (**29**) umsetzen ließen.

Um dennoch einen Zugang zu einem dieser hydroxygruppenhaltigen Derivate (**38**) ohne Schutzgruppenchemie zu erhalten, wurde eine andere retrosynthetische Zerlegung vorgenommen. Dabei wurde nicht an der Doppelbindung getrennt sondern am Pyrimidinring des Mittelteils. Die **38** kann somit auf die einfachen Bausteine Curcumin (**20**) und Thioharnstoff (**39**) zurückgeführt werden (**Schema 06**).

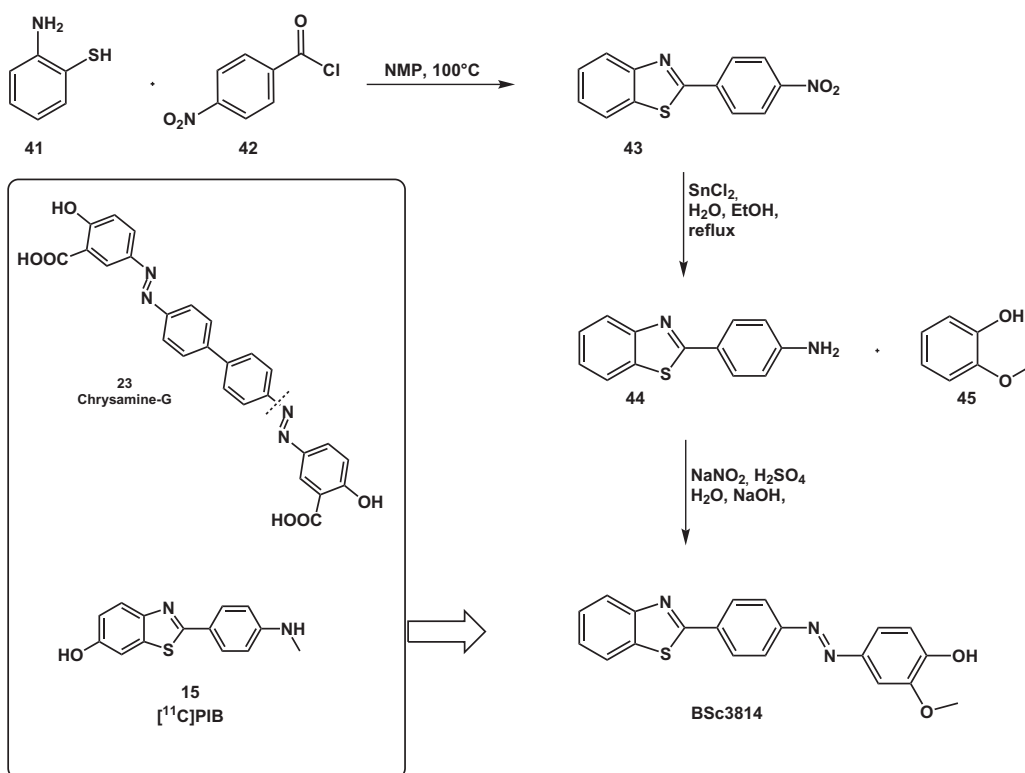


Schema 06: Retrosynthetische Zerlegung eines Divinyldiazin-thiol Derivates in Curcumin 21 und Thioharnstoff 39.

Die Umsetzung von Curcumin (**21**) mit Thioharnstoff (**40**) wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht. Dabei wurde das Lösungsmittel von Methanol, Methanol/Wasser, Ethanol über Dimethylformamid variiert. Ebenso wurden der Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes systematisch getestet. Die Reaktion wurde dazu sowohl konventionell als auch mikrowellenunterstützt durchgeführt. Die jeweilige Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC Analytik. Es konnte leider in keinem Experiment eine Umsetzung beobachtet werden.

Aus einer weiteren Substanzklasse, die motiviert war durch Chrysamin G (**23**) und PIB (**15**), ursprünglich konzipiert als Aggregationsinhibitor für A β - und Tau-Ablagerungen, zeigt im Verlauf der Untersuchungen Potential für die Diagnostik. Die Synthese des repräsentativen Derivates **BSc3814** gelang ausgehend von dem Aminothiol **41** mit dem 4-Nitrobenzoylchlorid **42** über eine Zyklisierung zu dem Vorläufer **43**. Die *para*-Nitrofunktionalität wurde zu **44** reduziert und schließlich zu **BSc3814** über eine Azokupplung mit **45** umgesetzt (**Schema 07**).

Die **BSc3814** zeigte in zellfreien Tau-Aggregation-Inhibitions-Assay gute inhibitorische Effekte bei niedrigen Konzentrationen ($IC_{50}=0.5\ \mu M$ und $DC_{50} = 0.3\ \mu M$). Die histologische Untersuchungen auf AD-Gewebe zeigte selektive Anfärbungen der spezifischen pathologischen Merkmale (s. Kapitel 3.6.2.3). Aufgrund der unzureichenden Fluoreszenzeigenschaften wurde aufbauend auf dieser Strukturklasse die Diazofunktionalität durch eine im Substitutionsmuster chemisch breiter zu variierende Hydrazinbrücke ersetzt, dies war allerdings nicht mehr Teil dieser Arbeit. **BSc3814** zeigte im Zebrafisch-Embryonen-Assay bereits vollständige Toxizität bei $10\ \mu M$. Aufgrund der gelb-orangen Färbung ist sowohl die Anreicherung im Dottersack aber auch Kopfbereich sichtbar. Die Toxizität schließt eine *in vivo* Verwendung, jedoch als Fluoreszenzmarker aus.



Schema 07: Darstellung von **BSc3814** als Aggregationsinhibitor und Marker Substanz.

Die derzeit erfolgversprechendsten Farbstoffe für eine fluoreszenzdiagnostische Anwendung sind **BSc4090** und **BSc4097**. Sie konnten sowohl in der histologischen Untersuchung (Kapitel 3.6.2.4) als auch in *in vivo* Experimenten am Mausmodell ihre Fähigkeiten als Marker deutlich zeigen. Es sind weiterhin Daten aus Verdrängungsassays bekannt die eine etwa 7-fach höhere Affinität an Aβ- und Tau-Ablagerungen für **BSc4090** im Vergleich zu dem Methoxy-XO4 (**24**; **BSc3924**) belegen.

Die in Lösung bestimmten Fluoreszenzeigenschaften von **BSc4090** sind durch einen breiten Anregungsbereich und einen mit ca. 100 nm großen Stokes-Shift gekennzeichnet. Die Emission nach Bindung an Aβ-Plaques und an neurofibrilläre Bündel hat ein Maximum bei 510 nm. Sie sind dadurch sehr gut von den in humanen Hirngewebe vorkommenden Lipofuscinablagerungen zu unterscheiden, die ein Emissionsmaximum bei 570 nm haben (**Abb. 18**)

Die in **Schema 05** dargestellten kalkulierten physikochemischen Eigenschaften sind unter dem Aspekt einer nach den Lipinsky Regel auf Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit zu bewertenden Substanz ebenfalls eine gute Ausgangsbasis. Dies deckt sich auch mit ersten im Mausmodell

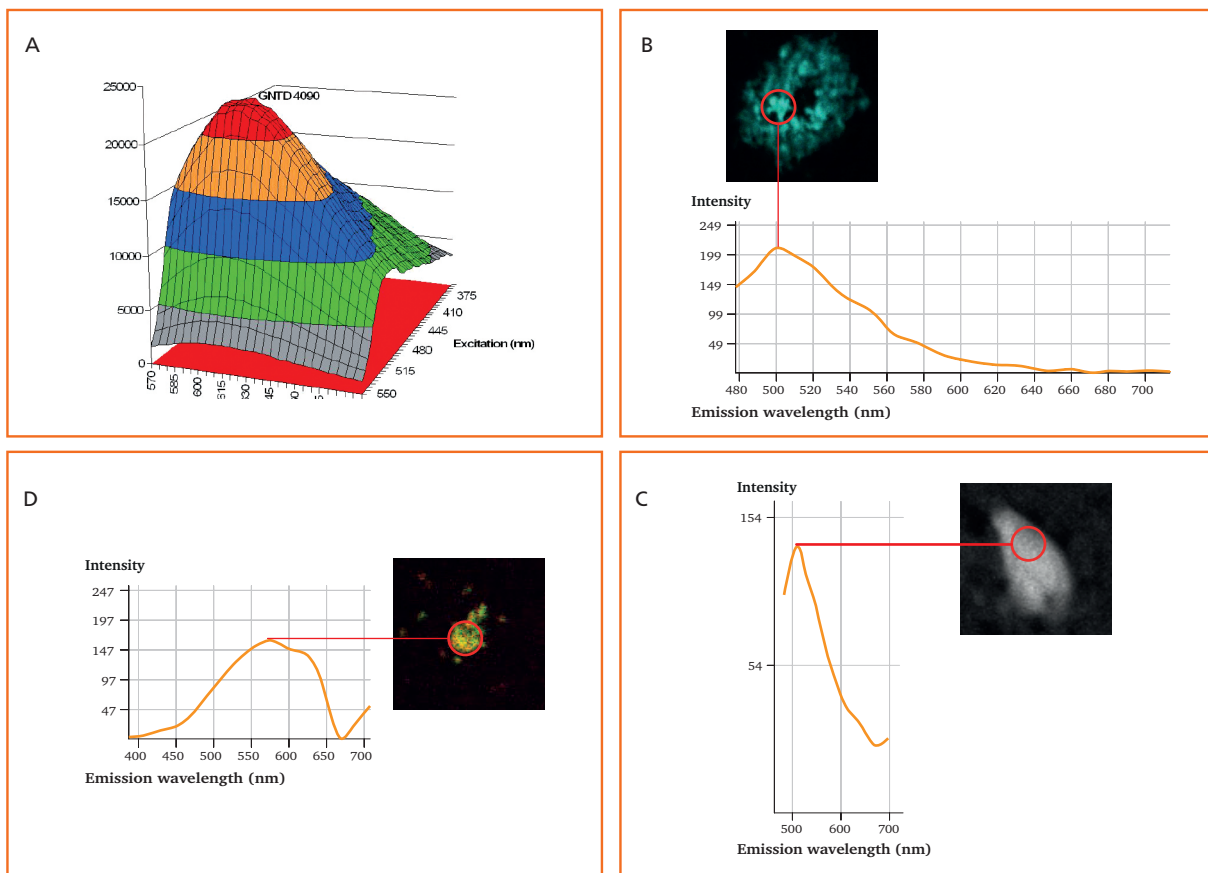


Abb. 18: **A:** 2D-Abs/Em-Spektrum von **BSc4090** gemessen in Methanol. **B:** Humanes Ammonshornpräparat mit **BSc4090** gefärbte Plaque angeregt bei 458 nm; **C:** Humanes Ammonshornpräparat mit **BSc4090** gefärbte neurofibrilläre Bündel angeregt bei 458 nm; **D:** Humanes Ammonshornpräparat Lipofuscin-Eigenfluoreszenz angeregt bei 458 nm (Konfokales Mikroskop Zeiss; Pinhole: CHs 512 μ m; Filter: 473-719 nm; Objektive: Plan Apochromat 20x/1.0W Zeiss).

gemachten Untersuchungen. Aus diesen gemachten Vorarbeiten und der Idee einer Kombination einer fluoreszierenden Probe mit der entsprechenden Diagnostik wurden die nachfolgenden Patentanmeldungen formuliert. Ein Großteil der in die Patentanmeldungen eingeflossenen Derivate mit den zugehörigen Fluoreszenzeigenschaften auf den pathologischen A β -Ablagerungen und den neurofibrillären Bündeln sind in Kapitel 3.6.2.4 beschrieben.

Es sind darin folgende im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen enthalten:

BSc4090, BSc4097, BSc4187, BSc4207, BSc4223, BSc4224, BSc4225, BSc4226, BSc4227, BSc4228, BSc4229, BSc4309, BSc4311, BSc4326, BSc4327, BSc4328, BSc4519, BSc4520, BSc4522, BSc4523, BSc4527, BSc4528, BSc4559

3.5.1 Fluoreszente Retinasonden für die Alzheimer-Diagnostik

Der Inhalt dieses Kapitels wurde am 20. September 2010 zum Patent angemeldet:

Deutsche Patentanmeldung Nr.: DE 10 2010 045 796.5

Patentanmelder: Klinikum Darmstadt GmbH, Ludwig-Maximilians-Universität,
Technische Universität Darmstadt.

Erfinder: Prof. Dr. Boris Schmidt, Dipl.-Ing. Daniel Kieser, Dr. Roland Heyny-von
Haußen, Prof. Dr. Jochen Herms, Dipl.-Ing. Alexander Boländer.

Titel: „Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen an
der Retina“.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung beschreibt Substanzen mit hoher Affinität an die pathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Demenz sowie anderer neurodegenerativer Demenzen, das sind das A β -Protein und die neurofibrillären Bündel des Tau Proteins sowie α -Synuclein bei Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Die Substanzen sollen für Differentialdiagnosen von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Die Substanzen erzeugen nach entsprechender Gabe in geringer Dosis eine Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden Pathogene an der Retina.

Das Verfahren ermöglicht dadurch mit im Vergleich zu anderen weniger aussagekräftigen Verfahren wie CT, PET und SPECT eine preiswerte ophthalmologische *in vivo* Untersuchung. Dabei ist eine Verbindung von Frühdiagnose und generellen Vorsorgeuntersuchungen auch für große Patientengruppen möglich.

Auf den folgenden Seiten sind einige wichtige Auszüge aus der Patentanmeldung wiedergeben:

Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen an der Retina

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen mit Affinität für das A β -Protein, für α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung solcher Verbindungen zu Diagnosezwecken sowie ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen.

Die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson bringt für die Patienten erhebliche Vorteile in der Therapie. Allerdings ist die sichere Diagnose des Morbus Alzheimer, insbesondere die der frühen Krankheitsstadien, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch postmortale mikroskopische Untersuchung sicher möglich.

Die aktuellen Methoden am lebenden Alzheimer-Patienten sind heterogen und stützen sich auf Fremdanamnese, bildgebende Verfahren, kognitive Tests und Ausschluss anderer neurodegenerativer Erkrankungen. Die Diagnose am lebenden Patienten, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung, ist oft nicht klar von anderen Demenzen abzugrenzen. Wenn erste Symptome im Kurzzeitgedächtnis auftreten, sind meist bereits erhebliche pathologische Veränderungen im Gehirn erfolgt. Zum Teil können diese Veränderungen mit so genannten nicht invasiven Untersuchungsmethoden erkannt werden, wie z.B. Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) und Positronenemissionstomografie (PET).

WO2009155017 offenbart radiopharmazeutische Zusammensetzungen, die eine hohe Affinität für Amyloid-Plaques besitzen und über Positronenemissionstomografie nachgewiesen werden.

WO2007136996 beschreibt cyanine Farbstoffe, die zur Markierung von Biomolekülen genutzt werden, z.B. für die *in vivo* Diagnose von Krebs.

US20020133019 offenbart Thioflavin-Derivate für die ante mortem *in vivo* Diagnose unter anderem von Alzheimer. Markierte Thioflavine binden dabei an Amyloid-Plaques und werden über Gamma-Imaging, MRT oder NMR-Spektroskopie
5 detektiert.

Keine dieser Methoden und Farbstoffe ist in der Lage, frühe Stadien der Krankheiten zu erkennen und benötigt im Falle der Positronenemissionstomografie eine sehr teure und nicht weit verbreitete Infrastruktur.

10 Die Entnahme von Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) zum Nachweis erhöhter A β -Werte erfordert eine Rückenmarkspunktion. Es stellt damit eine invasive Untersuchungsmethode dar, ist mit einer nicht zu vernachlässigenden Komplikationsrate verbunden und somit insbesondere nicht für
15 Vorsorgeuntersuchungen geeignet.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, geeignete diagnostische Sonden für den Nachweis von neurodegenerativen Erkrankungen bereitzustellen, die über ein optisches Detektionsverfahren nachgewiesen werden können.

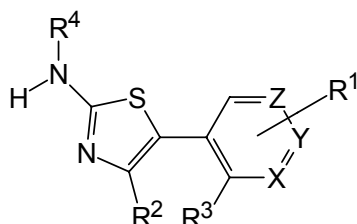
20 Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch die Verwendung von bestimmten Verbindungen zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung weisen diese Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) auf:

- 25 a) eine > 10fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- 30 d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
- e) einen $\log \text{P}$ -Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å².

Insbesondere weisen Verbindungen der folgenden Stoffklassen drei und mehr der
35 vorgenannten Eigenschaften auf, so dass die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen betrifft, welche eine Affinität zum A β -Protein, α -Synuclein und/oder

Tau-PHF-Aggregaten besitzen und daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind.

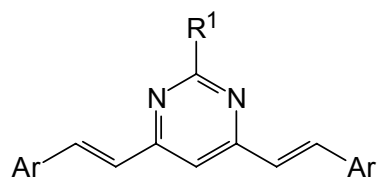
- 5 Verbindungen der Substanzklasse der Arylaminothiazole umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

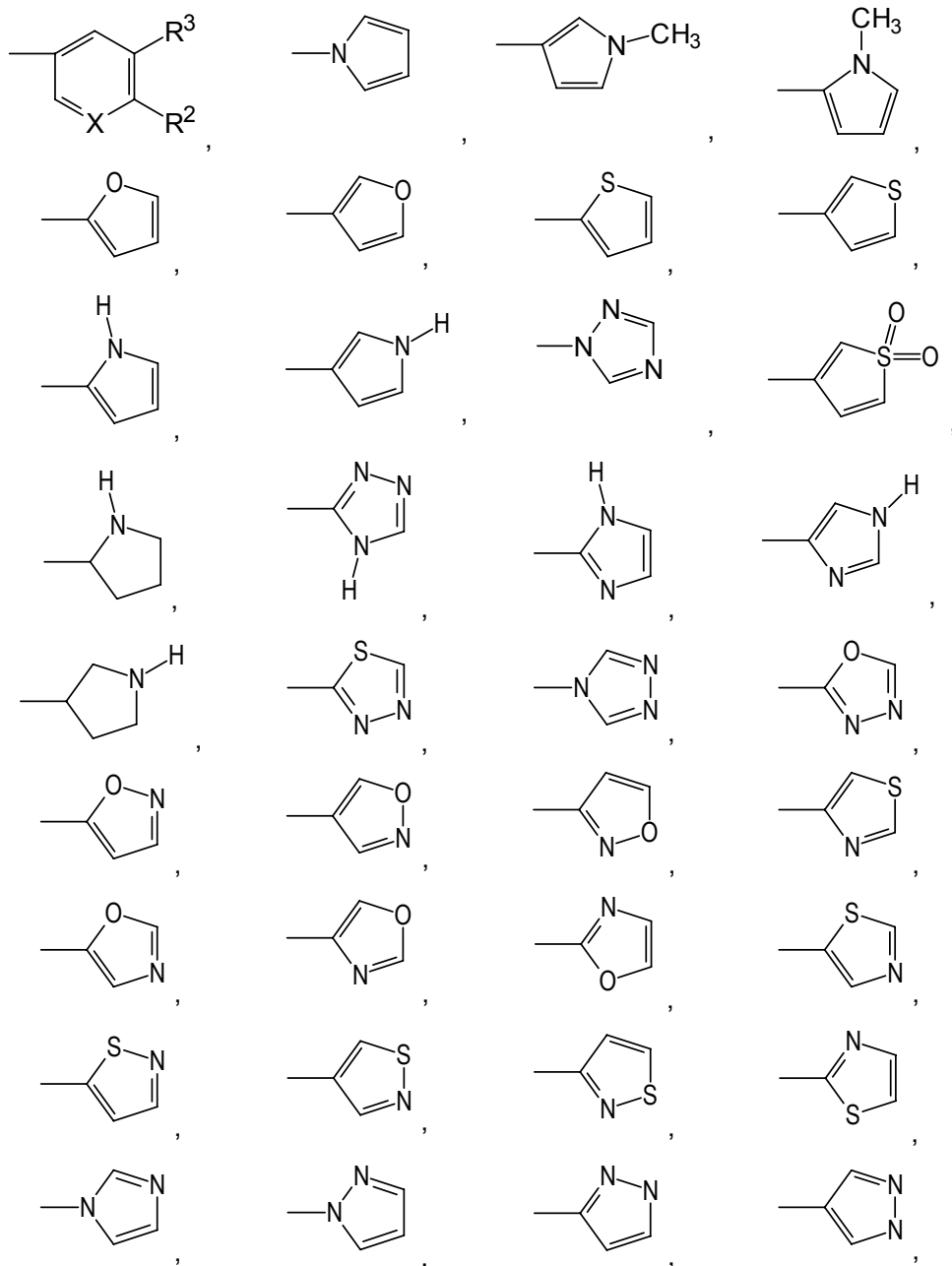
X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

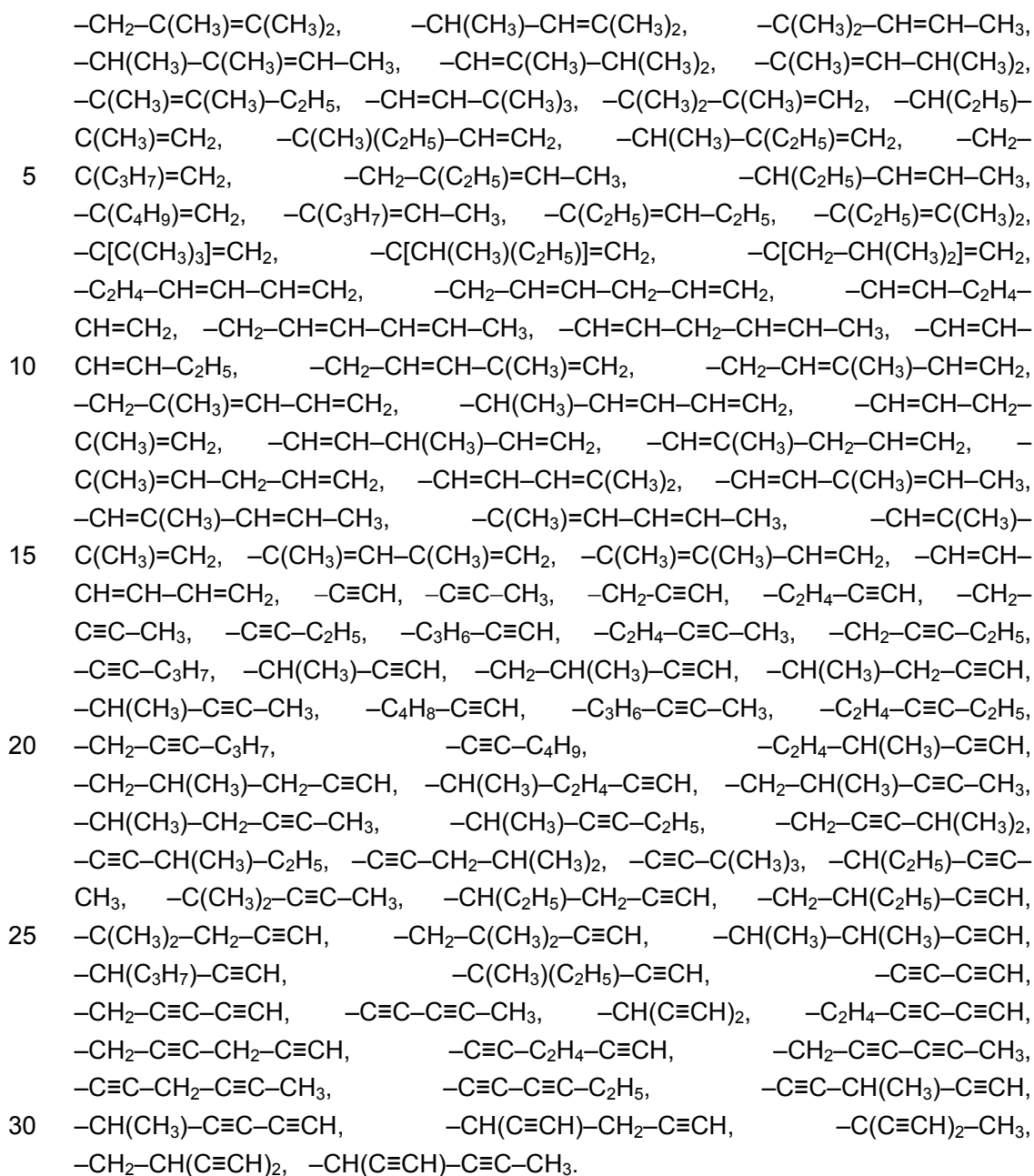
- 10 R^1, R^2, R^3, R^4 unabhängig voneinander C_1 - C_6 -Alkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, C_2 - C_6 -Alkynyl, C_4 - C_6 -Alkeninyl, C_3 - C_{10} -Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkanoyl, C_6 - C_{16} -Aryl, C_6 - C_{16} -Heteroaryl, C_1 - C_6 -Haloalkyl, C_2 - C_6 -Haloalkenyl, C_2 - C_6 -Haloalkinyl, C_4 - C_6 -Haloalkeninyl, C_3 - C_{10} -Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃,
 15 -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO- C_1 - C_6 -Alkyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -O-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CO-NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -CO-N(C_1 -
 20 C_6 -Alkyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -SO- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₃H, -SO₃- C_1 -
 25 C_6 -Alkyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO-N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.
- 30 Verbindungen der Substanzklasse der 4,6-Divinylpyrimidine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:





Besonders bevorzugt sind Substituenten aus der Gruppe der Phenole, Methylanilin, Dimethylanilin, Methyl-2-aminopyridin, Dimethyl-2-aminopyridin.

35

Alle erfindungsgemäß eingesetzten und verwendbaren Verbindungen der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder der Diarylharnstoffe verfügen vorzugsweise über mindestens zwei und weiter bevorzugt

muss aber nicht, Teil des diagnostischen Verfahrens sein. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das Gewinnen der zur Diagnose vorgesehenen Probe kein Schritt des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens.

- 5 Bei der *in vivo* Diagnostik werden die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina nachgewiesen.

Die erfindungsgemäßen Arylaminothiazole, 4,6-Divinyldiprimidine, 3,6-Divinyldipridazine, 2,5-Divinyldipirazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe werden besonders bevorzugt zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Arylaminothiazole, 4,6-Divinyldiprimidine, 3,6-Divinyldipridazine, 2,5-Divinyldipirazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone oder Diarylharnstoffe in der Retina nachgewiesen.

Die Erfindung umfasst insbesondere ein Verfahren zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen umfassend,

- 20 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyldiprimidine, 3,6-Divinyldipridazine, 2,5-Divinyldipirazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
- 25 b) Diagnostizieren der (vermuteten) neurodegenerativen Erkrankung in der Retina.

Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur *in vivo* Detektion von A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregaten umfassend,

- 30 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyldiprimidine, 3,6-Divinyldipridazine, 2,5-Divinyldipirazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
- b) Detektieren der (gebundenen) A β -Proteine, α -Synucleine oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina.

35

Die hierin genannten Verbindungen wirken vorzugsweise als fluoreszente Sonden. Sie besitzen eine (vorzugsweise hohe) Affinität für das A β -Protein, α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate und binden - vorzugsweise spezifisch - an diese. Die Bindung der erfindungsgemäßen Verbindungen an eines oder mehrere der oben

- genannten Zielproteine ist optisch detektierbar. Die Extinktionszunahme bei Bindung an das Zielprotein ist bevorzugt gekennzeichnet durch eine >10x Zunahme der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber der freien Verbindung und kann experimentell z.B. durch die Verringerung des Hintergrundrauschens bestimmt werden. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ aufweisen. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bz.w der Extinktion erfolgt in bestimmten Ausführungsformen bei 25°C, pH 7, dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Verbindung mit DMSO als Lösungsmittel.
- Der Unterschied zwischen Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum wird als Stokes-Shift bezeichnet und dieser Wert bestimmt im Wesentlichen, wie gut eine Verbindung für Fluoreszenz-Untersuchungen geeignet ist. Umso größer der Stokes-Shift, desto leichter können Unterschiede zwischen Emission und Exzitation detektiert werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind bevorzugterweise durch einen Stokes-Shift >20 nm charakterisiert.
- Besonders bevorzugt sind weiterhin Verbindungen, die eine Halbwertszeit *in vivo* von >60 min besitzen. Hierzu werden in bestimmten Ausführungsformen Verweildauer und Ausscheidungsrate entsprechend markierter Sonden (z.B. ^3H , ^{11}C , ^{18}F) bestimmt.
- Die Affinität der fluoreszenten Sonden wird im Regelfall durch die Verdrängung von fluoreszenten oder radioaktiven Referenzliganden indirekt bestimmt. In einer Ausführungsform ist die Affinität der erfindungsgemäßen Liganden durch eine Verdrängung von Thioflavin S, Thioflavin T oder 11C-PIB mit einem $\text{EC}_{50} < 300\text{nM}$ charakterisiert. Diese kann z.B. gemessen werden, wie in Lockhart et al., March 4, 2005, The Journal of Biological Chemistry, 280, 7677-7684 unter Material & Methoden beschrieben worden ist, im Speziellen die beiden Absätze „Radioligand Competition Assay“ und „Fluorescence Competition Assay“.
- Bevorzugt sind Verbindungen, die eine erhöhte potentielle Hirngängigkeit bei reduzierter Bindung an weiße Hirnmasse aufweisen sowie eine reduzierte Plasmaprotein-Bindung besitzen.
- Das Diffusionsvermögen einer Verbindung durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich durch seine Fettlöslichkeit (Lipophilie) und Größe bestimmt. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Molmasse <500 g/mol.

Der *log P*-Wert und der *log D*-Wert sind Modellmaße für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Substanz. Die Erwartung ist, mit Hilfe des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten die Verteilungskoeffizienten dieses Stoffes in anderen Systemen mit einer wässrigen und einer lipophilen Phase abschätzen zu können. Der *log P*-Wert ist größer als eins, wenn eine Substanz besser in fettähnlichen Lösungsmitteln wie *n*-Oktanol löslich ist, kleiner als eins wenn sie besser in Wasser löslich ist. Entsprechend ist *log P*-Wert positiv für lipophile und negativ für hydrophile Substanzen. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen *log P*-Wert von 1 bis 2,8 haben. In weiteren Ausführungsformen sind Verbindungen mit einem *log D*-Wert < 5 bevorzugt. Die Messung des *log P*-Werts oder des *log D*-Werts erfolgt über ein Oktanol/Wasser-Zwei-Phasensystem und UV/VIS-Spektroskopie bei 25°C und pH 7. Da nicht für alle Chemikalien der *log P*-Wert und/oder der *log D*-Wert gemessen werden kann, gibt es auch andere Modelle für die Vorhersage, z.B. durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) oder durch Linear Free Energy Relationships (LFER).

Die potentielle Hirngängigkeit der Verbindungen kann auch über die topological polar surface area (TPSA) definiert werden. Diese ist definiert als die Summe der Oberflächenbeiträge der polaren Atome (in der Regel Sauerstoffatome, Stickstoffe und/oder Wasserstoffatome) in einem Molekül. Die Berechnung wurde unter anderem von Ertl, P. et al., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3714-3717 beschrieben. Bevorzugt sind damit insbesondere Verbindungen mit einem TPSA <70 Å².

Ladungsfreiheit bzw. eine schwache Basizität der Verbindungen fördern die gute Penetration durch die Blut-Hirnschranke. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind weiterhin durch eine gute Photostabilität (geringe Photobleichung) und durch eine kurzlebige Singulettanregung gegenüber einer langlebigen Triplettanregung charakterisiert.

In weiteren Ausführungsformen besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine oder mehrere der folgenden physikochemischen Eigenschaften. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, welche mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen:

- a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,

- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

5

Bevorzugt sind weiterhin Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – f):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

15

Weiterhin bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – g) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – g):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$,
- g) einen log D-Wert < 3 .

25

30

Ebenso bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften a) und d):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,

35

- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å².

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen
- 5 Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – i) auf:
- a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
 - 10 c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - d) EC50 < 300 nM,
 - e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
 - f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å²,
 - g) eine Molmasse < 500 g/mol,
 - 15 h) eine Halbwertszeit *in vivo* von > 60 min,
 - i) einen log D-Wert < 3.

- Die hierin offenbarten Verbindungen sind besonders vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Tauopathien.
- 20 Die Gruppe der Tauopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins, eines niedermolekularen Phosphoproteins, welches sich in Zellen an stützende Zytoskelett-Proteine (Mikrotubuli) anlagert und deren Zusammenbau reguliert, im Gehirn ist.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin genannten Verbindungen für die frühzeitige Diagnose von Tauopathien genutzt, wie z.B. Morbus Alzheimer, kortikobasale Degeneration, agryophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 (Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17) oder progressive supranukleäre Blickparese.
- 30 Die Verbindungen sind erfindungsgemäß weiterhin vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Synucleinopathien. Die Gruppe der Synucleinopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des α-Synuclein-Proteins im Gehirn ist, wie z.B. Morbus Parkinson. Das α-Synuclein-Protein ist ein Protein von 140 Aminosäuren, das normalerweise nur in den presynaptischen Fortsätzen von Neuronen vorkommt. α-Synuclein ist ein Hauptbestandteil von neuronalen intrazellulären Proteinaggregaten (= Levy-Körperchen), dem charakteristischen neuropathologischen Merkmal der Synucleinopathien.
- 35

Diagnostische Zusammensetzungen, enthaltend mindestens eine Verbindung aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe, werden in einer zum Erreichen einer detektierbaren optischen Antwort in der bildgebenden Diagnostik effektiven Dosis verabreicht. Eine detektierbare optische Antwort ist dadurch charakterisiert, dass eine Änderung oder das Auftreten eines optischen Signals beobachtet oder durch Instrumente gemessen werden kann. In bestimmten Ausführungsformen handelt es sich bei der optischen Antwort um eine Änderung der Fluoreszenz, wie z.B. eine Änderung in der Intensität, Exzitations- oder Emissionswellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder Fluoreszenz-Polarisation.

Die Verbindungen aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]-hydrazone und Diarylharnstoffe können systemisch oder lokal verabreicht werden. In einer Ausführungsform werden die Verbindungen intravenös verabreicht. In einer anderen Ausführungsform werden die fluoreszenten Sonden parenteral verabreicht. In einer weiteren Ausführungsform werden die Verbindungen enteral verabreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen oral verabreicht. Die Zusammensetzungen mit den erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen enthalten typischerweise eine effektive Konzentration der Verbindungen in einer wässrigen Lösung oder Suspension, welche weiterhin Puffer, Tenside, Thixotropiermittel, Cosolventien, Geschmacksmittel oder dergleichen enthalten kann.

Die hierin genannten Verbindungen sind vorzugsweise in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In weiteren Ausführungsformen können die erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen die Blut-Retina-Schranke überwinden.

Neben dem Gehirn befinden sich die krankheitsursächlichen Proteinablagerungen auch in der Retina.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Verbindungen nach Anlagerung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina des Patienten nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mittels Adaption der Lichtfaseroptiken oder der Fluoreszenzmikroskopie.

Die Detektion an der Retina erfolgt in einer Ausführungsform unter Verwendung adaptierter Retinas Scanner. Hierzu kann z.B. der konfokale Retina-Laserscanner der Firma Heidelberger Engineering benutzt werden (Heidelberg Retina Angiograph 2,

HRA2). Die Detektion kann auch über eine Funduskamera und/oder über einen Laserscanner in Kombination mit Fluoreszenz- (z.B. ICG) und Autofluoreszenztechniken (z.B. Lipofuszin) erfolgen. Alternativ kann die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer („fluorescence lifetime microscopy“, FLIM) und der spektralen Fluoreszenzverteilung zur hochsensitiven Bestimmung der Bindung der erfindungsgemäßen Sonde an das Target verwendet werden. Die gewebeschonende Anregung von Farbstoffen über die Multiphotonen-Mikroskopie bietet weiterhin ein Verfahren mit hoher Eindringtiefe. Als Lichtquellen sind sowohl Laser als auch mit Filtern versehene Lichtquellen geeignet.

Die Detektion erfolgt mittels geeigneter Filtersysteme oder Detektoren, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt ist eine Exzitation im Wellenlängenbereich von 380-900 nm und eine Emission bei 400-1000 nm. Besonders bevorzugt ist die Exzitation zwischen 450-500 nm und die Emission bei 600-650 nm oder 600-700 nm.

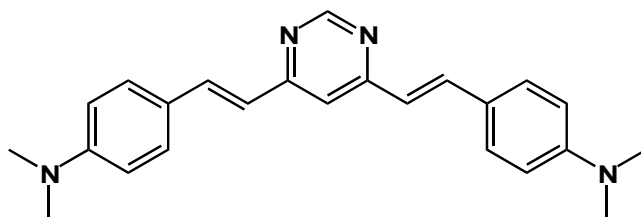
In einer weiteren Ausführungsform wird Alzheimer Demenz aufgrund der gesicherten Abwesenheit von Tau-Aggregaten im Darmepithel diagnostiziert. Die Tau-Aggregation im Darmepithel korreliert invers mit der Diagnose Alzheimer Demenz: Der fehlende Nachweis von Tau-Aggregaten mit den offenbarten Verbindungen ist ein sicheres Zeichen für Alzheimer Demenz.

Bevorzugt ist eine Verwendung der Verbindungen der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen.

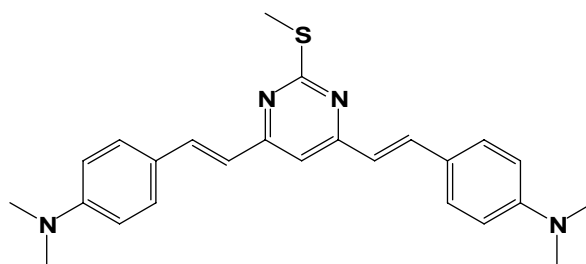
Über den Nachweis der vorgenannten Aggregate in der Retina ist es erstmals möglich neurodegenerative Erkrankungen nicht-invasiv und ante mortem zu erkennen und damit vorteilhaft einfach und schnell nachzuweisen. Der Einsatz der Verbindungen als fluoreszente Sonden hat den Vorteil, den apparativen Aufwand und damit auch die Kosten erheblich zu senken.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Verbindungen um folgende Verbindungen:

4-((1E)-2-(6-(4-(Dimethylamino)styryl)pyrimidin-4-yl)vinyl)-N,N-dimethylbenzylamin

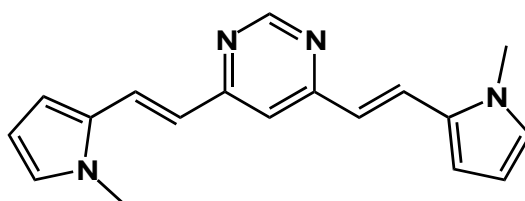


5 **4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-(Methylthio)pyrimidin-4,6-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)**



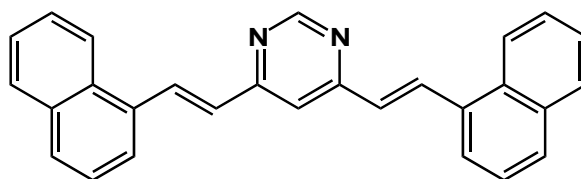
4,6-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrimidin

10

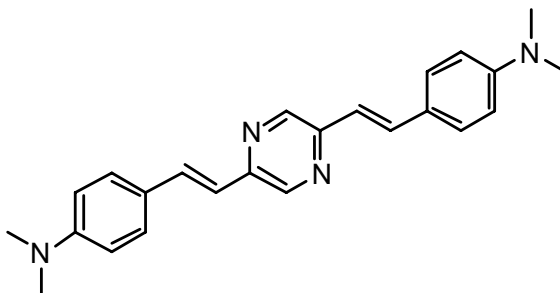


4,6-bis((E)-2-(Naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin

15

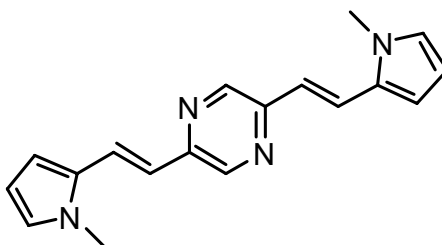


4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(Pyrazin-2,5-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)

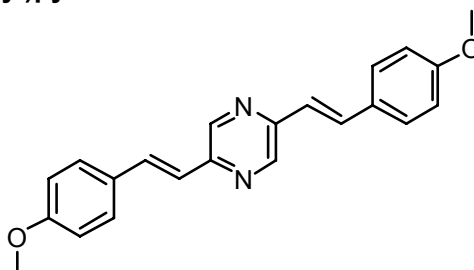


2,5-bis((*E*)-2-(1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazine

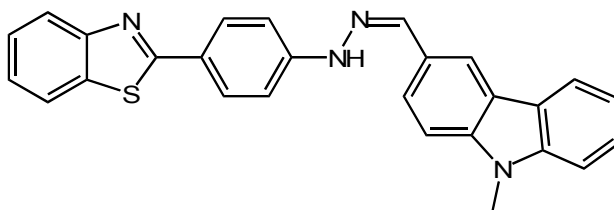
5



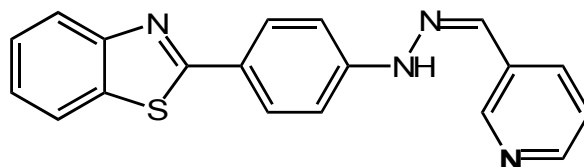
10 2,5-bis(4-Methoxystyryl)pyrazine



15 (Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((9-methyl-9H-carbazol-3-yl)methylen)hydrazine

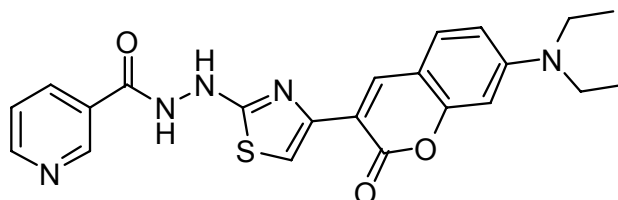


(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((pyridin-3-yl)methylen)hydrazin



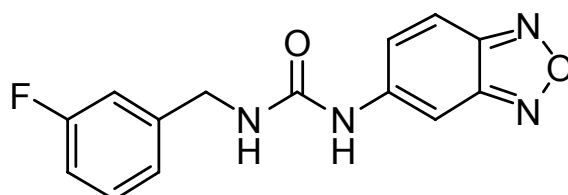
5

***N'*-(4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid**



10

1-(Benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(3-fluorbenzyl)harnstoff



15

Zusammenfassung

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen mit hoher Affinität für das
- 5 A β -Protein, α -Synuclein oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hoher
- 10 Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus.

3.5.2 Fluoreszente Sonden für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel

Der Inhalt dieses Kapitels wurde am 20. September 2010 zum Patent angemeldet: Entscheidende Vorarbeiten bezüglich des zu untersuchenden Gewebes und der damit verbundene Möglichkeit einer Krankheitsdiagnose sind in Kapitel 3.6.4 ausführlich dokumentiert.

Deutsche Patentanmeldung Nr.: DE 10 2010 045 796.5

Patentanmelder: Klinikum Darmstadt GmbH, Ludwig-Maximilians-Universität, Technische Universität Darmstadt.

Erfinder: Prof. Dr. Boris Schmidt, Dipl.-Ing. Daniel Kieser, Dr. Roland Heyny-von Haußen, Prof. Dr. Jochen Herms, Dipl.-Ing. Alexander Boländer.

Titel: „Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel“.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung beschreibt Substanzen mit hoher Affinität an die pathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Demenz sowie anderer neurodegenerativer Demenzen, das sind das A β -Protein und die neurofibrillären Bündel des Tau Proteins sowie α -Synuclein bei Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Die Substanzen sollen für Differentialdiagnosen von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Die Substanzen erzeugen nach entsprechender Gabe in geringer Dosis eine Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden Pathogene in der Nase, genauer dem Riechepithel.

Das Verfahren ermöglicht dadurch eine preiswerte fluoreszenzmikroskopische *in vivo* Untersuchung unter Nutzung entsprechender Endoskopsysteme. Dabei ist eine Verbindung von Frühdiagnose und generellen Vorsorgeuntersuchungen auch für große Patientengruppen möglich. Dies ist mit den derzeitigen Verfahren wie CT, PET und SPECT so nicht möglich.

Auf den folgenden Seiten sind einige wichtige Auszüge aus der Patentanmeldung wiedergeben:

Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen mit Affinität für das A β -Protein, für α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung solcher Verbindungen zu Diagnosezwecken sowie ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen.

Die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson bringt für die Patienten erhebliche Vorteile in der Therapie. Allerdings ist die sichere Diagnose des Morbus Alzheimer, insbesondere die der frühen Krankheitsstadien, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch postmortale mikroskopische Untersuchung sicher möglich.

Die aktuellen Methoden am lebenden Alzheimer-Patienten sind heterogen und stützen sich auf Fremdanamnese, bildgebende Verfahren, kognitive Tests und Ausschluss anderer neurodegenerativer Erkrankungen. Die Diagnose am lebenden Patienten, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung, ist oft nicht klar von anderen Demenzen abzugrenzen. Wenn erste Symptome im Kurzzeitgedächtnis auftreten, sind meist bereits erhebliche pathologische Veränderungen im Gehirn erfolgt. Zum Teil können diese Veränderungen mit so genannten nicht invasiven Untersuchungsmethoden erkannt werden, wie z.B. Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) und Positronenemissionstomografie (PET).

WO2009155017 offenbart radiopharmazeutische Zusammensetzungen, die eine hohe Affinität für Amyloid-Plaques besitzen und über Positronenemissionstomografie nachgewiesen werden.

WO2007136996 beschreibt cyanine Farbstoffe, die zur Markierung von Biomolekülen genutzt werden, z.B. für die *in vivo* Diagnose von Krebs.

US20020133019 offenbart Thioflavin-Derivate für die ante mortem *in vivo* Diagnose unter anderem von Alzheimer. Markierte Thioflavine binden dabei an Amyloid-Plaques und werden über Gamma-Imaging, MRT oder NMR-Spektroskopie
5 detektiert.

Keine dieser Methoden und Farbstoffe ist in der Lage, frühe Stadien der Krankheiten zu erkennen und benötigt im Falle der Positronenemissionstomografie eine sehr teure und nicht weit verbreitete Infrastruktur.

10

Die Entnahme von Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) zum Nachweis erhöhter A β -Werte erfordert eine Rückenmarkspunktion. Es stellt damit eine invasive Untersuchungsmethode dar, ist mit einer nicht zu vernachlässigenden Komplikationsrate verbunden und somit insbesondere nicht für
15 Vorsorgeuntersuchungen geeignet.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, geeignete diagnostische Sonden für den Nachweis von neurodegenerativen Erkrankungen bereitzustellen, die über ein optisches Detektionsverfahren am Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius
20 nachgewiesen werden können.

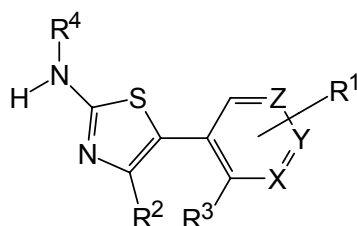
Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch die Verwendung von bestimmten Verbindungen zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung weisen diese Verbindungen
25 mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) auf:

- a) eine > 10fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
- 30 c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
- e) einen $\log P$ -Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

35 Insbesondere weisen Verbindungen der folgenden Stoffklassen drei und mehr der vorgenannten Eigenschaften auf, so dass die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen betrifft, welche eine Affinität zum A β -Protein, α -Synuclein und/oder

Tau-PHF-Aggregaten besitzen und daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind.

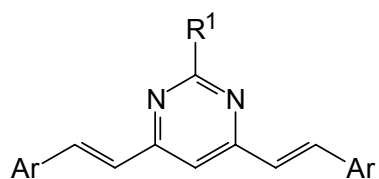
- Verbindungen der Substanzklasse der Arylaminothiazole umfassen Verbindungen,
5 die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

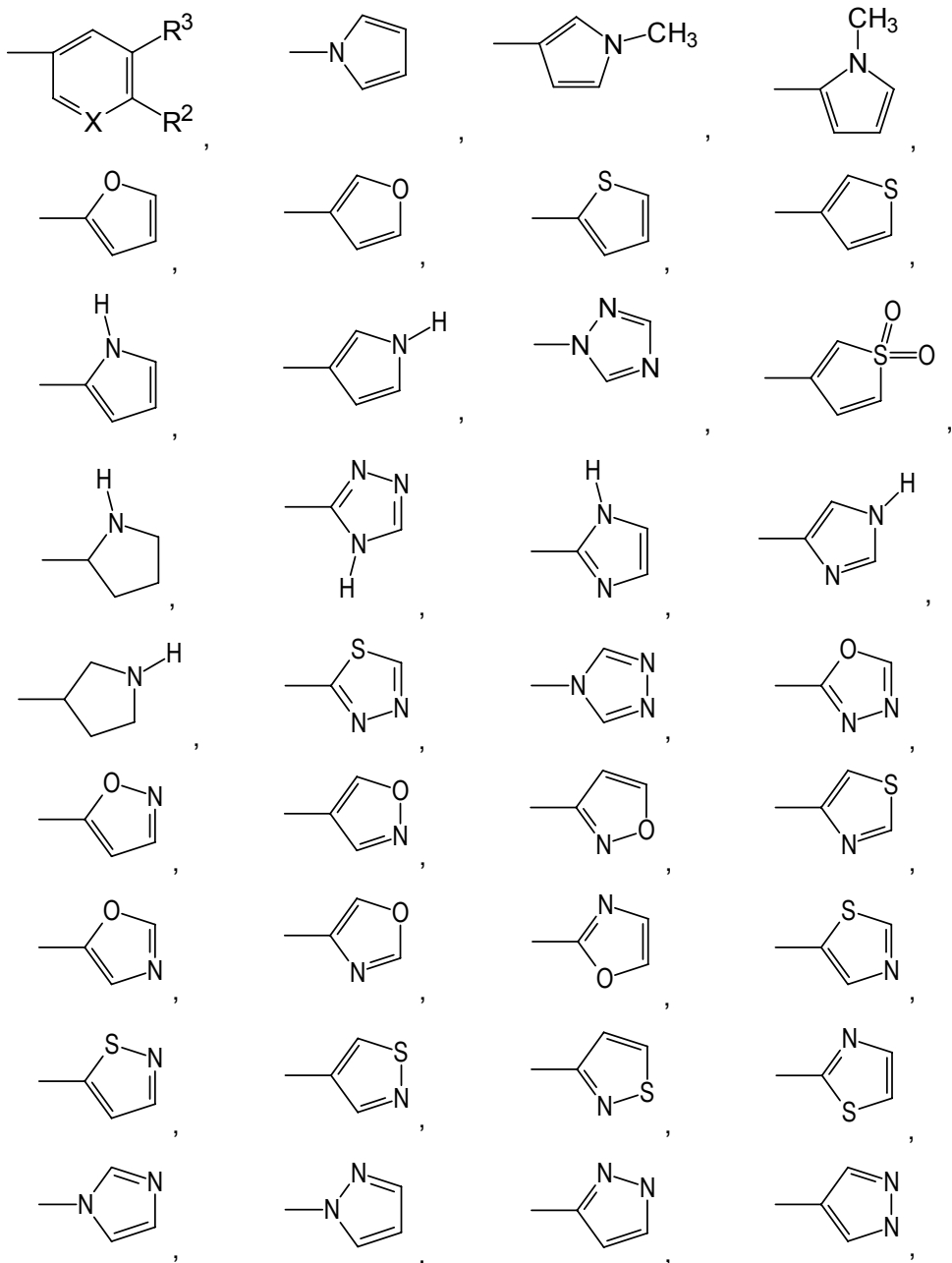
X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

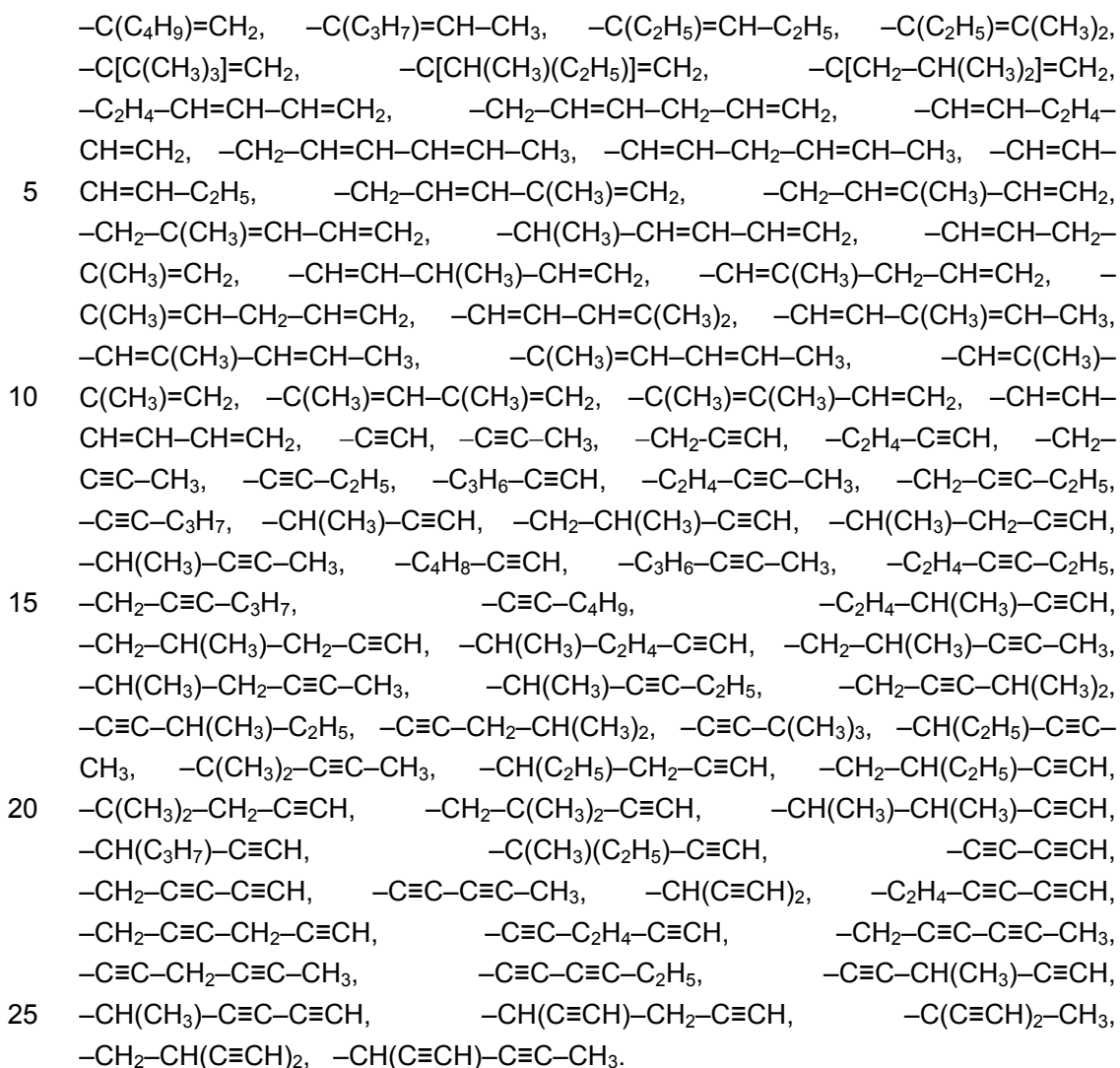
- 10 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 unabhängig voneinander C_1 - C_6 -Alkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, C_2 - C_6 -Alkynyl, C_4 - C_6 -Alkeninyl, C_3 - C_{10} -Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkanoyl, C_6 - C_{16} -Aryl, C_6 - C_{16} -Heteroaryl, C_1 - C_6 -Haloalkyl, C_2 - C_6 -Haloalkenyl, C_2 - C_6 -Haloalkinyl, C_4 - C_6 -Haloalkeninyl, C_3 - C_{10} -Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃,
15 -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO- C_1 - C_6 -Alkyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -O-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CO-NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -CO-N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -SO- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₃H, -SO₃- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO- C_1 - C_6 -
20 Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO-N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.
- 30 Verbindungen der Substanzklasse der 4,6-Divinylpyrimidine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:





Besonders bevorzugt sind Substituenten aus der Gruppe der Phenole, Methylanilin, Dimethylanilin, Methyl-2-aminopyridin, Dimethyl-2-aminopyridin.

30

Alle erfindungsgemäß eingesetzten und verwendbaren Verbindungen der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder der Diarylharnstoffe verfügen vorzugsweise über mindestens zwei und weiter bevorzugt über drei aromatische Ringe, welche direkt oder über eine Vinylbrücke oder über eine Harnstoffbrücke miteinander verbunden sind. Besonders bevorzugt sind Verbindungen mit drei aromatischen Ringen, welche über Vinylbrücken miteinander verbunden sind, wodurch sich ausgedehnte π -Elektronensysteme ergeben. Besonders bevorzugt sind Verbindungen der vorgenannten Klassen mit

delokalisierten Elektronen über mindestens 15 beteiligte Atome. Weiter bevorzugt sind Verbindungen mit π -Elektronensystemen, welche sich über mindestens 20 Atome erstrecken und insbesondere bevorzugt sind delokalisierte Elektronensysteme, welche sich über 22 oder mehr Atome erstrecken.

5

Bei den 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen und den 2,5-Divinylpyrazinen sind 22 Atome am π -Elektronensystem beteiligt, wenn Ar für einen 6-Ring steht, und das π -Elektronensystem erstreckt sich über 20 Atome, wenn Ar ein 5-Ring ist.

- 10 Die oben genannten Verbindungen können als fluoreszente Sonden zur Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Hierbei sind alle Arten von Erkrankungen eingeschlossen, die zu einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen führen. Die Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen basiert sowohl auf der klinischen Präsentation mit topographisch typischer Verteilung und
- 15 involviertem Zelltyp des degenerativen Prozesses als auch auf der Ablagerung von strukturell veränderten Proteinen wie Prion-Protein, Tau, Beta-Amyloid, Alpha-Synuclein, TDP-43 und/oder Huntington. Die Fluoreszenz der erfindungsgemäßen Substanzen wird bei Bindung an die Zielproteine entweder verstärkt oder signifikant verschoben. Dadurch ist erst das notwendige Signal-Rausch-Verhältnis möglich.

20

Der Begriff „Diagnostik oder Diagnose“ umfasst dabei die Bereiche *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* Diagnostik. Generell dient die Diagnostik oder Diagnose ausschließlich oder hauptsächlich dazu, Informationen zu liefern. Diese Informationen geben Aufschluss über:

- 25 • physiologische oder pathologische Zustände oder
- angeborene Anomalien oder
- dienen zur Prüfung auf Unbedenklichkeit und/oder Verträglichkeit bei potentiellen Empfängern und/oder
- zur Überwachung therapeutischer Maßnahmen.

30

Bei der *in vitro* bzw. *ex vivo* Diagnostik werden vom menschlichen Körper stammende Proben verwendet, wie z.B. Blut, Serum, Plasma, Seminalflüssigkeit, Spinalflüssigkeit, peritoneale Flüssigkeit, Speichel, Sputum, Tränenflüssigkeit, Urin, Biopsiematerial oder Gewebespenden. Das Gewinnen einer solchen Probe kann,

35 muss aber nicht, Teil des diagnostischen Verfahrens sein. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das Gewinnen der zur Diagnose vorgesehenen Probe kein Schritt des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens.

Bei der *in vivo* Diagnostik werden die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius nachgewiesen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe werden besonders bevorzugt zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone oder Diarylharnstoffe im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius nachgewiesen.
- 15 Die Erfindung umfasst insbesondere ein Verfahren zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen umfassend,
 - a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und
 - 20 Diarylharnstoffe; und
 - b) Diagnostizieren der (vermuteten) neurodegenerativen Erkrankung im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius.

- Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur *in vivo* Detektion von A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregaten umfassend,
- 25 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
 - 30 b) Detektieren der (gebundenen) A β -Proteine, α -Synucleine oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius.

- Die hierin genannten Verbindungen wirken vorzugsweise als fluoreszente Sonden. Sie besitzen eine (vorzugsweise hohe) Affinität für das A β -Protein, α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate und binden - vorzugsweise spezifisch - an diese.
- 35 Die Bindung der erfindungsgemäßen Verbindungen an eines oder mehrere der oben genannten Zielproteine ist optisch detektierbar. Die Extinktionszunahme bei Bindung an das Zielprotein ist bevorzugt gekennzeichnet durch eine >10x Zunahme der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber der freien

Verbindung und kann experimentell z.B. durch die Verringerung des Hintergrundrauschens bestimmt werden. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ aufweisen. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bzw. der Extinktion erfolgt in bestimmten Ausführungsformen bei 25°C, pH 7, dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Verbindung mit DMSO als Lösungsmittel.

Der Unterschied zwischen Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum wird als Stokes-Shift bezeichnet und dieser Wert bestimmt im Wesentlichen, wie gut eine Verbindung für Fluoreszenz-Untersuchungen geeignet ist. Umso größer der Stokes-Shift, desto leichter können Unterschiede zwischen Emission und Exzitation detektiert werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind bevorzugterweise durch einen Stokes-Shift $> 20 \text{ nm}$ charakterisiert.

Besonders bevorzugt sind weiterhin Verbindungen, die eine Halbwertszeit *in vivo* von $> 60 \text{ min}$ besitzen. Hierzu werden in bestimmten Ausführungsformen Verweildauer und Ausscheidungsrate entsprechend markierter Sonden (z.B. ^3H , ^{11}C , ^{18}F) bestimmt.

Die Affinität der fluoreszenten Sonden wird im Regelfall durch die Verdrängung von fluoreszenten oder radioaktiven Referenzliganden indirekt bestimmt. In einer Ausführungsform ist die Affinität der erfindungsgemäßen Liganden durch eine Verdrängung von Thioflavin S, Thioflavin T oder ^{11}C -PIB mit einem $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$ charakterisiert. Diese kann z.B. gemessen werden, wie in Lockhart et al., March 4, 2005, The Journal of Biological Chemistry, 280, 7677-7684 unter Material & Methoden beschrieben worden ist, im Speziellen die beiden Absätze „Radioligand Competition Assay“ und „Fluorescence Competition Assay“.

Bevorzugt sind Verbindungen, die eine erhöhte potentielle Hirngängigkeit bei reduzierter Bindung an weiße Hirnmasse aufweisen sowie eine reduzierte Plasmaprotein-Bindung besitzen.

Das Diffusionsvermögen einer Verbindung durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich durch seine Fettlöslichkeit (Lipophilie) und Größe bestimmt. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Molmasse $< 500 \text{ g/mol}$.

Der *log P*-Wert und der *log D*-Wert sind Modellmaße für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Substanz. Die

- Erwartung ist, mit Hilfe des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten die Verteilungskoeffizienten dieses Stoffes in anderen Systemen mit einer wässrigen und einer lipophilen Phase abschätzen zu können. Der *log P*-Wert ist größer als eins, wenn eine Substanz besser in fettähnlichen Lösungsmitteln wie *n*-Oktanol löslich ist, kleiner als eins wenn sie besser in Wasser löslich ist. Entsprechend ist *log P*-Wert positiv für lipophile und negativ für hydrophile Substanzen. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen *log P*-Wert von 1 bis 2,8 haben. In weiteren Ausführungsformen sind Verbindungen mit einem *log D*-Wert < 5 bevorzugt. Die Messung des *log P*-Werts oder des *log D*-Werts erfolgt über ein Oktanol/Wasser-Zwei-Phasensystem und UV/VIS-Spektroskopie bei 25°C und pH 7. Da nicht für alle Chemikalien der *log P*-Wert und/oder der *log D*-Wert gemessen werden kann, gibt es auch andere Modelle für die Vorhersage, z.B. durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) oder durch Linear Free Energy Relationships (LFER).
- Die potentielle Hirngängigkeit der Verbindungen kann auch über die topological polar surface area (TPSA) definiert werden. Diese ist definiert als die Summe der Oberflächenbeiträge der polaren Atome (in der Regel Sauerstoffatome, Stickstoffe und/oder Wasserstoffatome) in einem Molekül. Die Berechnung wurde unter anderem von Ertl, P. et al., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3714-3717 beschrieben. Bevorzugt sind damit insbesondere Verbindungen mit einem TPSA <70 Å².
- Ladungsfreiheit bzw. eine schwache Basizität der Verbindungen fördern die gute Penetration durch die Blut-Hirnschranke. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind weiterhin durch eine gute Photostabilität (geringe Photobleichung) und durch eine kurzlebige Singulettanregung gegenüber einer langlebigen Triplettanregung charakterisiert.
- In weiteren Ausführungsformen besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine oder mehrere der folgenden physikochemischen Eigenschaften. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, welche mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen:
- eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - einen Stokes-Shift von > 20 nm,
 - einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - EC50 < 300 nM,

- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

5 Bevorzugt sind weiterhin Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – f):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- 10 b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

15

Weiterhin bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – g) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – g):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- 20 b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- 25 e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$,
- g) einen log D-Wert < 3 .

30 Ebenso bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften a) und d):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- 35 b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – i) auf:

- a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
 - c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
 - e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
 - f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$,
 - g) eine Molmasse $< 500 \text{ g/mol}$,
 - h) eine Halbwertszeit *in vivo* von $> 60 \text{ min}$,
 - i) einen log D-Wert < 3 .
- Die hierin offenbarten Verbindungen sind besonders vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Tauopathien. Die Gruppe der Tauopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins, eines niedermolekularen Phosphoproteins, welches sich in Zellen an stützende Zytoskelett-Proteine (Mikrotubuli) anlagert und deren Zusammenbau reguliert, im Gehirn ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin genannten Verbindungen für die frühzeitige Diagnose von Tauopathien genutzt, wie z.B. Morbus Alzheimer, kortikobasale Degeneration, argyrophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 (Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17) oder progressive supranukleäre Blickparese.

Die Verbindungen sind erfindungsgemäß weiterhin vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Synucleinopathien. Die Gruppe der Synucleinopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des α -Synuclein-Proteins im Gehirn ist, wie z.B. Morbus Parkinson. Das α -Synuclein-Protein ist ein Protein von 140 Aminosäuren, das normalerweise nur in den presynaptischen Fortsätzen von Neuronen vorkommt. α -Synuclein ist ein Hauptbestandteil von neuronalen intrazellulären Proteinaggregaten (= Levy-Körperchen), dem charakteristischen neuropathologischen Merkmal der Synucleinopathien.

Diagnostische Zusammensetzungen, enthaltend mindestens eine Verbindung aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-

Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe, werden in einer zum Erreichen einer detektierbaren optischen Antwort in der bildgebenden Diagnostik effektiven Dosis verabreicht. Eine detektierbare optische Antwort ist dadurch charakterisiert, dass eine Änderung oder das Auftreten eines

5 optischen Signals beobachtet oder durch Instrumente gemessen werden kann. In bestimmten Ausführungsformen handelt es sich bei der optischen Antwort um eine Änderung der Fluoreszenz, wie z.B. eine Änderung in der Intensität, Exzitations- oder Emissionswellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder Fluoreszenz-Polarisation.

- 10 Die Verbindungen aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe können systemisch oder lokal verabreicht werden. In einer Ausführungsform werden die Verbindungen intravenös verabreicht. In einer anderen Ausführungsform werden die fluoreszenten Sonden parenteral verabreicht.
- 15 In einer weiteren Ausführungsform werden die Verbindungen enteral verabreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen oral verabreicht. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen topisch nasal verabreicht. Die Zusammensetzungen mit den erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen enthalten typischerweise eine effektive Konzentration der
- 20 Verbindungen in einer wässrigen Lösung oder Suspension, welche weiterhin Puffer, Tenside, Thixotropiermittel, Cosolventien, Geschmacksmittel oder dergleichen enthalten kann.

Die hierin genannten Verbindungen sind vorzugsweise in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

25 In weiteren Ausführungsformen können die erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen die Blut-Gewebe-Schranke, die Blut-Leber-Schranke, die Blut-Liquor-Schranke, die Liquor-Hirn-Schranke, die Blut-Nerven-Schranke und/oder die Plazentaschranke überwinden.

Neben dem Gehirn befinden sich die krankheitsursächlichen Proteinablagerungen

30 auch im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Verbindungen nach Anlagerung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius des Patienten

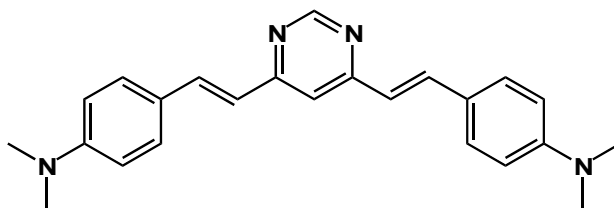
35 nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mittels Adaption der Lichtfaseroptiken oder der Fluoreszenzmikroskopie.

Die Detektion erfolgt mittels geeigneter Filtersysteme oder Detektoren, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt ist eine Exzitation im Wellenlängenbereich von

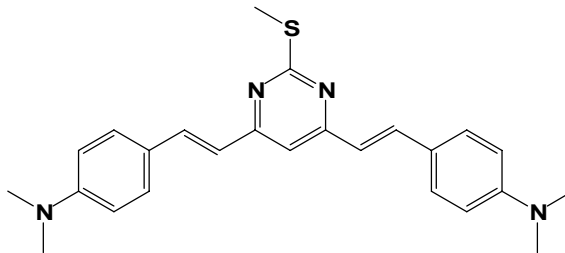
380-900 nm und eine Emission bei 400-1000 nm. Besonders bevorzugt ist die Exzitation zwischen 450-500 nm und die Emission bei 600-650 nm oder 600-700 nm.

- In einer weiteren Ausführungsform wird Alzheimer Demenz aufgrund der gesicherten
- 5 Abwesenheit von Tau-Aggregaten im Darmepithel diagnostiziert. Die Tau-Aggregation im Darmepithel korreliert invers mit der Diagnose Alzheimer Demenz: Der fehlende Nachweis von Tau-Aggregaten mit den offenbarten Verbindungen ist ein sicheres Zeichen für Alzheimer Demenz.
 - 10 Bevorzugt ist eine Verwendung der Verbindungen der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen.
 - 15 Über den Nachweis der vorgenannten Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius ist es erstmals möglich neurodegenerative Erkrankungen nicht-invasiv und ante mortem zu erkennen und damit vorteilhaft einfach und schnell nachzuweisen. Der Einsatz der Verbindungen als fluoreszente Sonden hat den Vorteil, den apparativen Aufwand und damit auch die Kosten erheblich zu senken.
 - 20 In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Verbindungen um folgende Verbindungen:

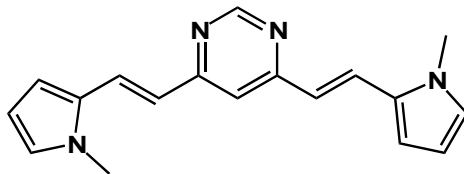
- 25 **4-((1E)-2-(6-(4-(Dimethylamino)styryl)pyrimidin-4-yl)vinyl)-N,N-dimethylbenzylamin**



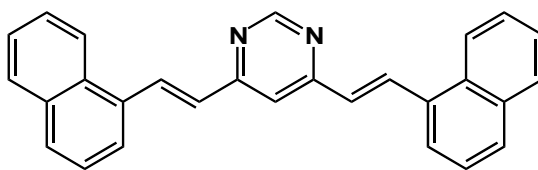
4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-(Methylthio)pyrimidin-4,6-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)



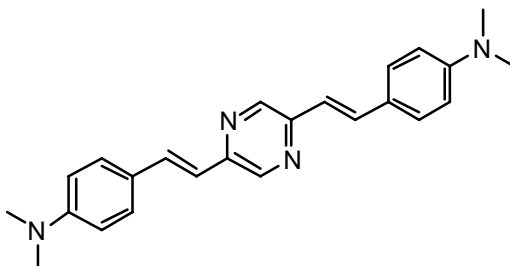
4,6-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrimidin



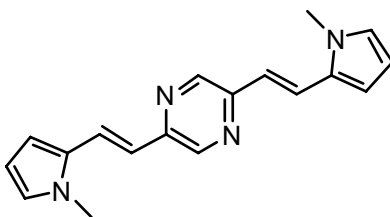
5 4,6-bis((E)-2-(Naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin



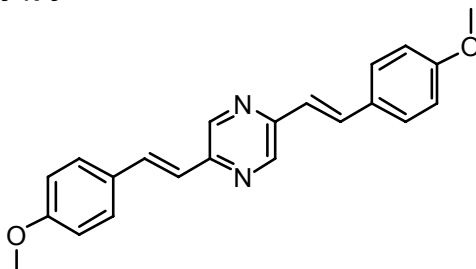
10 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(Pyrazin-2,5-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)



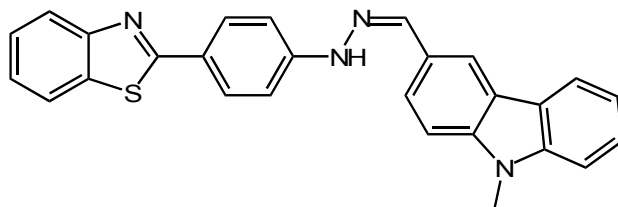
2,5-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazin



2,5-bis(4-Methoxystyryl)pyrazin

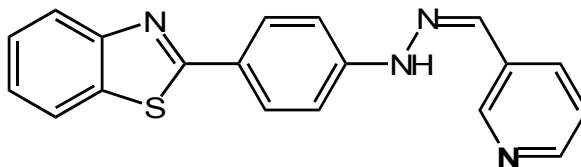


(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((9-methyl-9H-carbazol-3-yl)methylen)-hydrazin



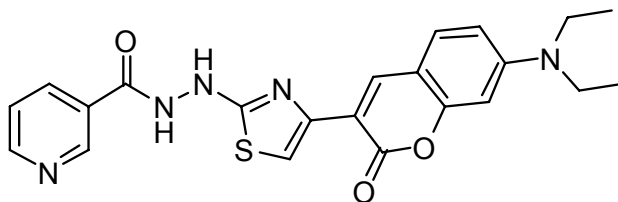
5

(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((pyridin-3-yl)methylen)hydrazin



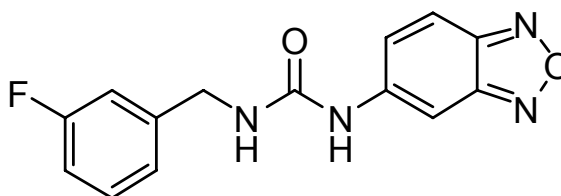
10

N'-(4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid



15

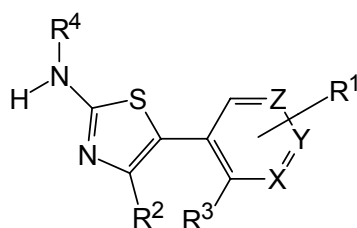
1-(Benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(3-fluorbenzyl)harnstoff



20

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung einer Verbindung zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, wobei die Verbindung mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweist:
 - a) eine > 10-fache Extinktionszunahme nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien
 - 10 Verbindung,
 - b) einen Stokes-Shift von > 20nm,
 - c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
 - e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
 - 15 f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å².
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei eine Verbindung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen zur Diagnose
- 20 von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die neurodegenerative Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe der Tauopathien.
- 25 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 3, wobei die neurodegenerative Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend oder bestehend aus Morbus Alzheimer, kortikobasaler Degeneration, argyophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 oder progressiver supranukleärer Blickparese.
- 30 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 4, wobei die Verbindung spezifisch an A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate bindet.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 5, wobei die Verbindung und deren Bindung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate
- 35 mittels Lichtfaseroptik oder Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 6, wobei die Arylaminothiazole folgende allgemeine Struktur besitzen:



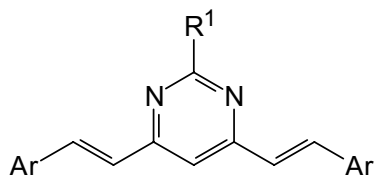
worin

X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

- R¹, R², R³, R⁴ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl, C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃, -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl), -NH(C₂-C₆-Alkenyl), -NH(C₂-C₆-Alkynyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -SO-C₁-C₆-Alkyl, -SO-C₂-C₆-Alkenyl, -SO-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂-C₁-C₆-Alkyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₃H, -SO₃-C₁-C₆-Alkyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen umfassen.

25

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 6, wobei die 4,6-Divinylpyrimidine folgende allgemeine Struktur besitzen:



30

worin

- COO–C₂–C₆–Alkenyl, –COO–C₂–C₆–Alkynyl, –O–CO–C₁–C₆–Alkyl, –O–CO–C₂–C₆–Alkenyl, –O–CO–C₂–C₆–Alkynyl, –CONH₂, –NH–CO–C₁–C₆–Alkyl, –NH–CO–C₂–C₆–Alkenyl, –NH–CO–C₂–C₆–Alkynyl, –CO–NH(C₁–C₆–Alkyl), –CO–NH(C₂–C₆–Alkenyl), –CO–NH(C₂–C₆–Alkynyl), –CO–N(C₁–C₆–Alkyl)₂, –CO–N(C₂–C₆–Alkenyl)₂, –CO–N(C₂–C₆–Alkynyl)₂, –NH(C₁–C₆–Alkyl), –NH(C₂–C₆–Alkenyl), –NH(C₂–C₆–Alkynyl), –N(C₁–C₆–Alkyl)₂, –N(C₂–C₆–Alkenyl)₂, –N(C₂–C₆–Alkynyl)₂, –SO–C₁–C₆–Alkyl, –SO–C₂–C₆–Alkenyl, –SO–C₂–C₆–Alkynyl, –SO₂–C₁–C₆–Alkyl, –SO₂–C₂–C₆–Alkenyl, –SO₂–C₂–C₆–Alkynyl, –SO₃H, –SO₃–C₁–C₆–Alkyl, –SO₃–C₂–C₆–Alkenyl, –SO₃–C₂–C₆–Alkynyl, –SO₂NH₂, –O–COO–C₁–C₆–Alkyl, –NH–CO–NH₂, –NH–CO–NH–C₁–C₆–Alkyl, –NH–CO–N(C₁–C₆–Alkyl)₂, –Ph, –CH₂–Ph oder –CH=CH–Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.
19. Ex-vivo-Verfahren zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen umfassend die folgenden Schritte:
- a) Zugeben einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone oder der Diarylharnstoffe, zu einer Probe oder Biopsie eines Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung; und
 - b) Diagnostizieren der neurodegenerativen Erkrankung mittels Lichtfaseroptik oder Fluoreszenzmikroskop.

Zusammenfassung

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen mit hoher Affinität für das
- 5 A β -Protein, α -Synuclein oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hoher
- 10 Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus.

3.6 Aufbau einer histologischen Evaluierung neuer fluoreszierender Farbstoffe

Die histologische Untersuchung *post mortem* am Gehirn des Patienten ist derzeit die einzige Möglichkeit der eindeutigen Diagnose einer Alzheimer-Demenz. Die Anfärbung der entsprechenden Gewebepreparationen erfolgt im klinischen Alltag mit dem bereits in der Einleitung erwähnten Farbstoff Thioflavin (12) (s. Seite 25), an Ammonshornpräparaten (Ammonshorn = Gehirnwindung im inneren des Großhirns, die zum Hippocampus gehört).

Die Evaluierung fluoreszierender Farbstoffe anhand histologischer Untersuchungen ist eine schnelle Bestimmungsmethode hinsichtlich dessen Fähigkeit, A β - und Tau-Proteine zu markieren. Im Hinblick auf eine spätere Retinadiagnostik können damit wesentliche Eckpunkte einer solchen Probe ermittelt werden, wie zum Beispiel die qualitative Evaluierung der Affinität, der Selektivität und die zugehörigen Fluoreszenzeigenschaften auf dem Target.

Im Forschungsfeld der Alzheimer-Demenz verwenden viele Wissenschaftler für vergleichbare Untersuchungen Gewebe aus transgenen Mäusen mit entsprechender Pathologie. Der Nachteil dieser Gewebeproben, die aus solchen Tieren stammen, ist ihr artifizieller Charakter hinsichtlich der Krankheitspathologie. Je nach verwendetem Mausmodell wird nur ein bestimmtes Merkmal der AD-Pathologie abgebildet. Zum Beispiel können sich die von der Maus expremierten Tau-Isoformen von den Humanen deutlich unterscheiden. ^[14, 73]

Exemplarisch dafür ist die Testung von **BSc4090** auf Tau-P301L transgenen Mäusen. Es konnte keinerlei spezifische Anfärbung des von dieser Maus überexprimierten Tau-Proteins beobachtet werden. In der Histologie am menschlichen Gehirn färbt die Probe jedoch humane Tau-Ablagerungen hervorragend. Es liegen also Unterschiede zwischen den menschlichen Tau-Isoformen und den entsprechenden im Tiermodell vor. Eine Selektivitätsevaluierung auf humanem Gewebe ist somit sinnvoll.

In den nachfolgenden Kapiteln sind die aus diesen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit dem Klinikum Darmstadt gemachten bisher weitgehend unveröffentlichten Ergebnisse beschrieben.

3.6.1 Anmerkungen zu der histologischen Färberoutine

Die Technik, durch selektive Anfärbungen Gewebe stärker zu kontrastieren, ist in der Mikroskopie eine klassische Methode.^[103] Dabei sollten die verwendeten Marker für einen guten Kontrast eine hohe Affinität und Selektivität zu den pathologischen Gewebemerkmale haben, wie dies für Thioflavin (12) auf A β - und Tau-Ablagerungen der Fall ist (Abb. 01, s. Seite 11). Es wird folglich als Referenz für die qualitative Bewertung der Färbungen verwendet.

Die Färbungen wurden an Gewebeschnitten durchgeführt, die aus paraffinfixierten Gewebeproben hergestellt wurden. Kontrollexperimente an frischem menschlichem Hirngewebe ergaben identische Färberesultate. Das angewandte Färbeprotokoll für die Thioflavinfärbung umfasst mehrere Schritte, die ausschließlich auf der Basis von Wasser als Lösungsmittel beruhen (Kapitel 4.4.1). Die wichtigsten Schritte dabei sind: die vorlaufende Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin und anschließend die Einfärbung der A β -Plaques und neurofibrillären Bündel mit Thioflavin (12).^[104] Eingebettet in dieses Protokoll sind Waschschrte und eine abschließende Fixierung. Dieses Protokoll wurde auf die zu untersuchenden Farbstoffe übertragen mit dem Unterschied, dass Thioflavin (12) durch die jeweiligen Farbstoffe ersetzt wurde (Kapitel 4.4.2). Es musste allerdings eine Alternative zu dem wässrigen Protokoll entwickelt werden, da die Farbstoffe meist schlecht wasserlöslich waren.

Die aus der elutropen Reihe nahe liegende Verwendung von Ethanol oder Methanol erwies sich dabei als zweckmäßig. Substanzen, die auch in Methanol noch nicht vollständig in Lösung gingen, wurden bei Bedarf durch Zusatz von bis zu 10% Dimethylsulfoxid meist hinreichend gelöst. Färbungen mit ausschließlich in Dimethylsulfoxid gelösten Farbstoffen lieferten unstete Ergebnisse und wurden wegen dieser schlechten Reproduzierbarkeit vermieden.

Neben dem Einfluss des Lösungsmittels bezüglich Qualität und Reproduzierbarkeit hatte auch das Auftragungsprotokoll des Farbstoffes Auswirkungen auf das Färbeergebnis. Die Anfangs praktizierte Direktauftragung der Färbelösung hatte den Vorteil, nur sehr geringe Substanzmengen zu benötigen. Als großer Nachteil stellte sich aber das Eintrocknen oder Auskristallisieren des Farbstoffes auf der Oberfläche heraus.

Daraufhin wurden die Färbungen unter mit Lösungsmittel gesättigter Atmosphäre in einer (so genannten) feuchten Färbekammer durchgeführt, um die oben genannten Nachteile zu vermeiden. Da dieses Verfahren allerdings kaum Verbesserung brachte, wurden spezielle Färbekammern angefertigt. Angepasst an das Format des Objektträgers haben diese speziellen Tauchkammern ein Füllvolumen von zwei mL, das ausreichend war, um den Objektträger komplett in die Färbelösung einzutauchen. Dadurch wurde gleichzeitig die Färbekonzentration abgesenkt und Eintrocknung oder Auskristallisation vermieden.

Neben der Referenz Thioflavin (**12**) wurde für die relative Auswertung Methoxy-XO4 (**BSc3924**) herangezogen, da diese Verbindung in Tierexperimenten die etablierte Fluoreszenzmarkerverbindung darstellt. Diese färbt die pathologischen Merkmale ebenfalls mit hoher Selektivität und weist dabei eine gute Fluoreszenzintensität auf. Die Differenzierung vom Hintergrund durch den daraus folgenden Kontrast ist sehr gut (**Abb. 19**).

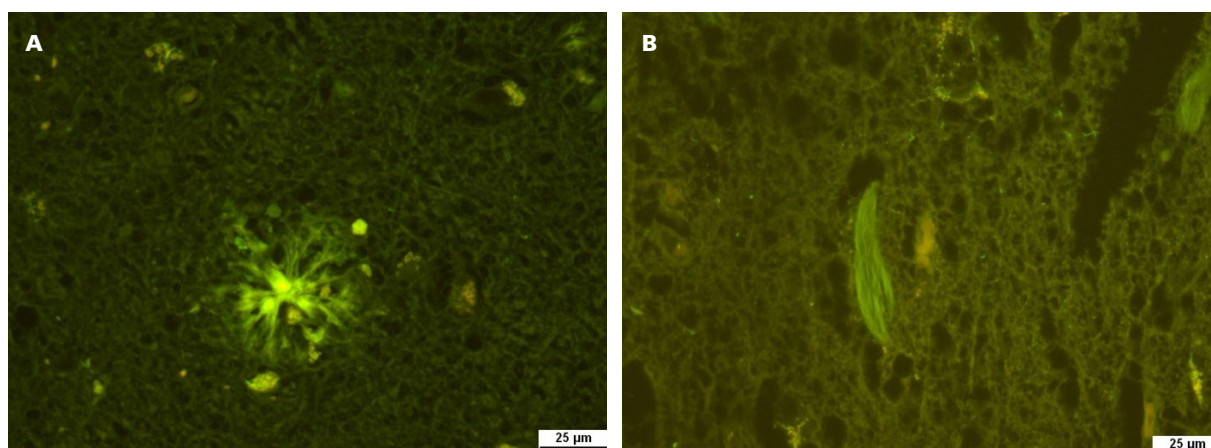


Abb. 19: Gewebe: Ammonshorn, Patient: männlich, 89 Jahre; Farbstoff: Methoxy-XO4 (**BSc3924**). Es sind Aβ-Plaques (**A**) und Neurofibrilläre Bündel (**B**) zu sehen.

Eine ausführliche Dokumentation aller Färbeprotokolle und Färbeergebnisse sowie alle ausgewerteten Färbungen finden sich unter dem Kapitel 4.4.

3.6.2 Die verschieden untersuchten Farbstoffklassen im Überblick

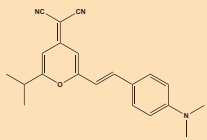
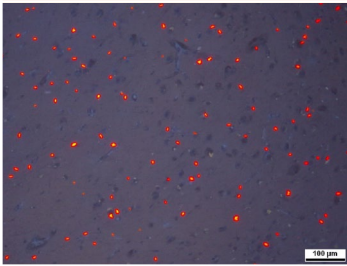
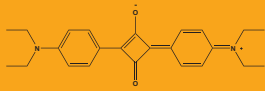
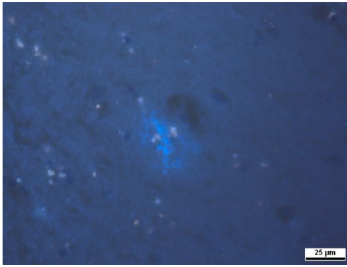
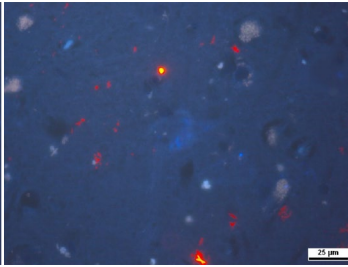
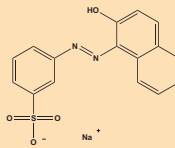
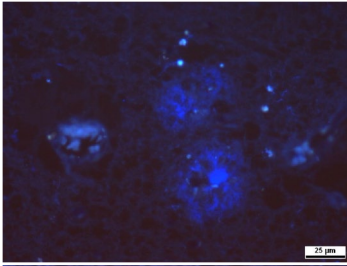
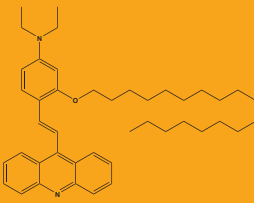
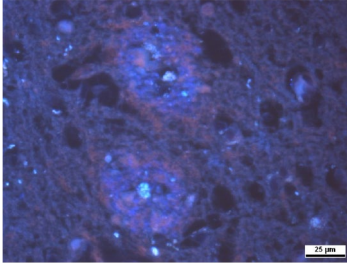
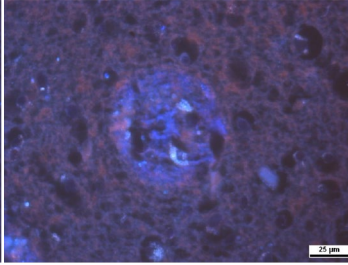
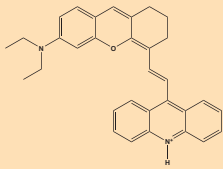
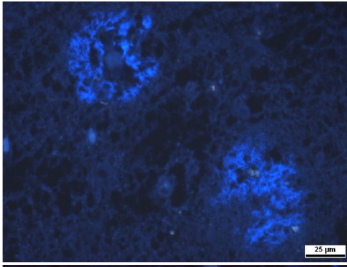
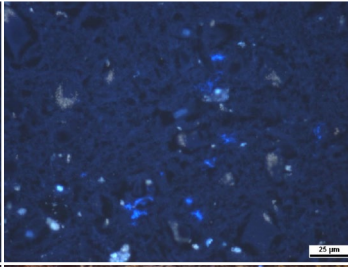
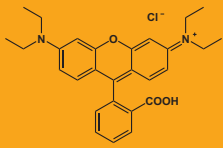
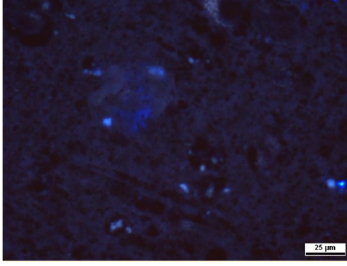
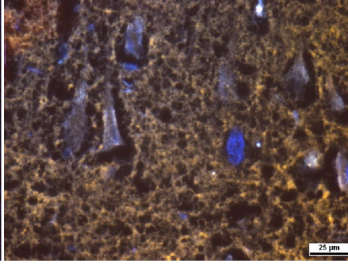
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von verschiedenen Farbstoffen einer histologischen Evaluierung auf Gewebeschnitten des Ammonshorns unterzogen. Die dabei gewonnenen wesentlichen Ergebnisse in Bezug auf eine selektive Anfärbung und die fluoreszierenden Eigenschaften auf dem kranken Gewebe werden in den nachfolgenden Tabellen dargestellt. Eine detaillierte Einzeldarstellung der jeweiligen Färbeergebnisse findet sich, wie bereits erwähnt, in Kapitel 4.4.2. Die in den Tabellen gemachten Anmerkungen (Anm.) unterteilen die relative Bewertung der Farbstoffe in folgende Kategorien: 1) spezifische Färbung des Gewebes, 2) Fluoreszenzintensität der Färbung und 3) Kontrast zum restlichen Gewebe. Dies wird jeweils auf A β -Plaques (A β :) und neurofibrillären Bündeln (NFT:) untersucht. Die Bewertungskriterien unterteilen sich in gut (+), mäßig (o) und schlecht (-). (Beispiel: A β : + - -, bedeutet die spezifische Färbung¹⁾ ist gut, die Fluoreszenzintensität²⁾ und der Kontrast³⁾ sind jeweils schlecht auf den A β -Plaques).

In den folgenden Unterkapiteln sind die Farbstoffe nach ihrer strukturellen Verwandtschaft aufgelistet und in wesentlichen Punkten bezüglich ihrer Färbereigenschaften erläutert. Die in den Anmerkungen aufgeführte Kategorie „weitere Beobachtungen“ (wei. Beob.) beinhaltet Beobachtungen weiterer histologischer Auffälligkeiten. Dazu zählten die Färbung von: Bowman-Drüsen (Bow:) auf mit diesem Farbstoff untersuchten Nasengewebe (Kapitel 3.6.4.1), zerebralen Angiopathien (zer. Angio.) und Astrozytenfortsätze (Astrof.) die teilweise auch auf dem untersuchten Gewebe zu beobachten waren. Einige der Farbstoffe unterlagen während der Beobachtung auch einer starken Photobleiche (Phbl.) mit Bleichzeiten kleiner einer Minute.

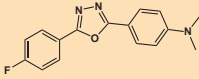
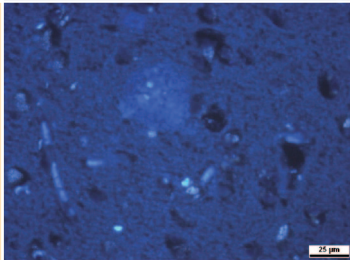
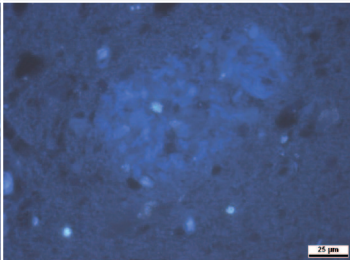
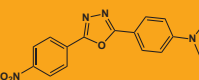
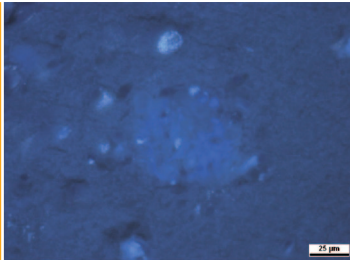

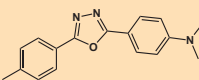
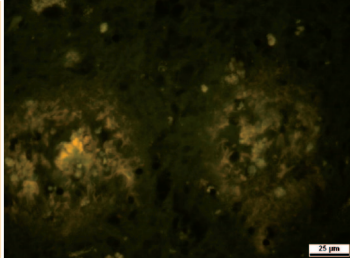
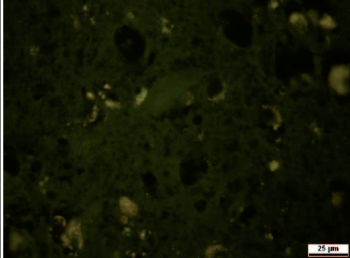
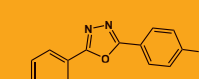
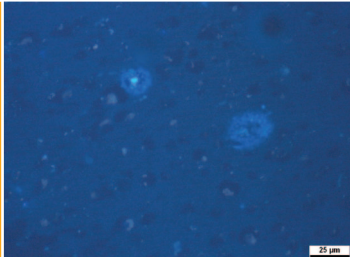
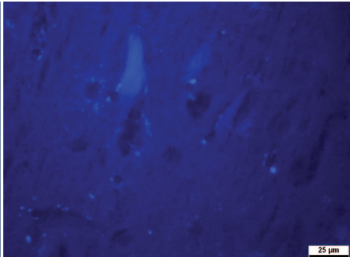
3.6.2.1 Diverse Farbstoffstrukturen und ihre Färbereigenschaften

Die nachfolgend aufgeführten Farbstoffe sind eine Auswahl aus verschiedenen Strukturklassen für die Evaluation von Leitstrukturen (Tab. 03). Der aus den Quadratsäuren abgeleitete Farbstoff **BSc4446** wies eine gewisse Selektivität auf den pathologischen Gewebemerkmalen auf, die Fluoreszenzeigenschaften waren aber nicht zufriedenstellend. Das Azaanalogon der Monostilbene des kommerziellen Farbstoffes **Orange2** zeigte auf A β -Ablagerungen gute Färbe- und Fluoreszenzeigenschaften aber keine Färbung von NFTs.

Die Untersuchung einer Reihe von Xanthenfarbstoffen, die aus dem Bereich der Textilfärbung stammen, wurde induziert durch eine Recherche bezüglich ihres Färbeverhaltens an Wolle und Seide.

Name/Bez. Struktur	Färbung Aβ	Färbung NFT/Sonstiges	Anm. ¹⁾²⁾³⁾
BSc4444 			Aβ: - - - NFT: - - -
BSc4446 			Aβ: + o o NFT: + o o
Orange 2 			Aβ: + + + NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: - - -
BSc4089 			Aβ: + o o NFT: - - - wei. Beob.: blau auf Aβ Bow.: + o o
BSc4091 			Aβ: + o + NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: - - -
Rhodamin B 			Aβ: + o o NFT: + o + wei. Beob.: Bow.: + + o pH Abh.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite. (Tab. 3)

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4559 			A β : + o o NFT: - - -
BSc4525 			A β : + o =/- NFT: - - -
BSc4526 			A β : + + + NFT: - - -
BSc4359 			A β : + + + NFT: + o o

Tab. 03: Weitere diverse Farbstoffe in der histologischen Testung.

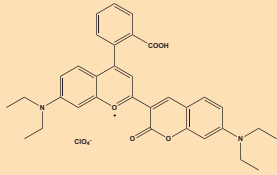
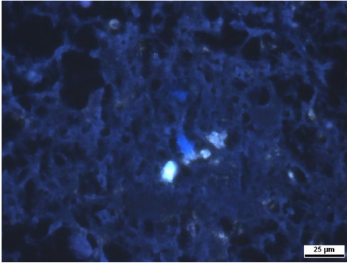
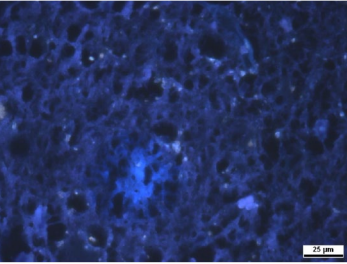
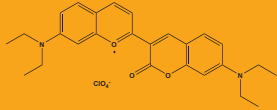
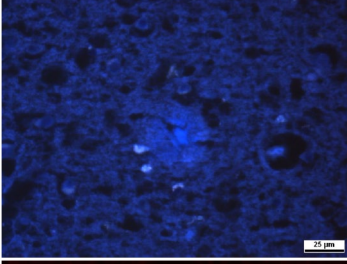
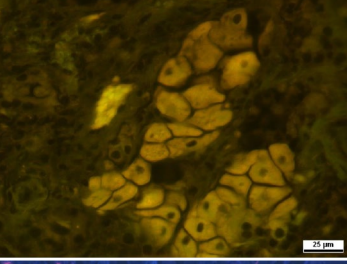
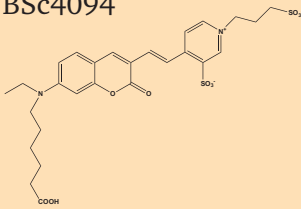
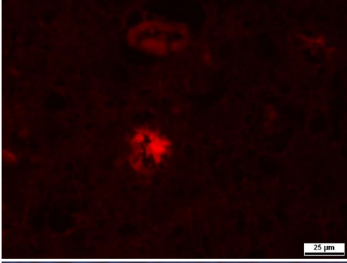
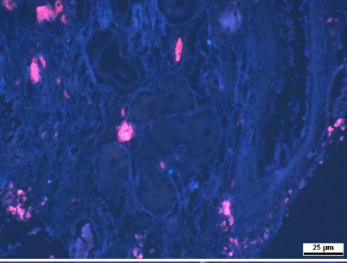
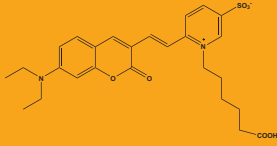
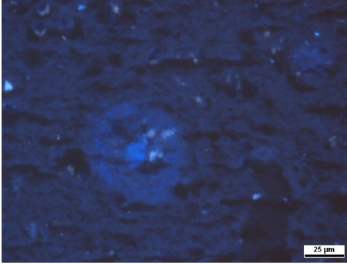
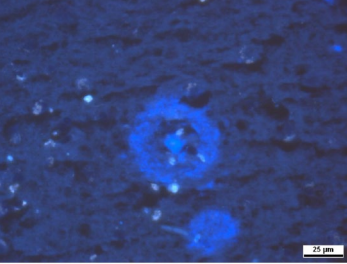
Dabei zeigte die Färbungen mit dem daraus ermittelten Farbstoff **Rhodamin B**, dass Affinität an A β und Tau-Ablagerungen besteht. Weitere Derivate (**BSc4089/4091**) hingegen konnten lediglich eine Anfärbung der A β -Ablagerungen bewirken. Die Fluoreszenzeigenschaften auf dem Target waren dabei nur mäßig, obwohl die Farbstoffe in Lösung eine sehr intensive Fluoreszenz aufweisen. Wodurch diese Fluoreszenzlöschung hervorgerufen wird, kann in diesem Fall und auch für die anderen Farbstoffe, bei denen ein solches Phänomen beobachtet wurde, nicht genauer ermittelt werden.

Die Oxadiazol-basierten Farbstoffe, die in 2009 als weitere Leitstruktur für neue Marker ausgewiesen worden sind, zeigten ein spezifisches Färbeverhalten und die Fluoreszenz Intensitäten waren vergleichbar gut wie die von Thioflavin, allerdings war es nicht möglich Tau-Ablagerungen zu detektieren (**Tab. 03**, ab **BSc4559**).^[105] Es wurden deshalb keine weiteren Derivate synthetisiert und entsprechend untersucht.

3.6.2.2 Benzopyran oder Chromen abgeleitete Farbstoffe

Eine Serie von Benzopyran-abgeleiteten Farbstoffen, auch als Chromene bekannt, die sich durch teilweise sehr große Stokes Verschiebung auszeichnen, wurden untersucht (**Tab. 04/05**). Sie zeigten Affinität an A β -Ablagerungen, jedoch mit sehr schwacher Fluoreszenzintensität. Die Anfärbung von neurofibrillären Bündel konnte überwiegend nicht beobachtet werden. Im Fall von **BSc4092/4094** bestätigte sich diese Selektivität zu A β -Ablagerungen auch dadurch, dass keine spezifische Bowman-Drüsen-Anfärbung beobachtet werden konnte (s. Kapitel 3.6.4.1). Anders verhielt sich dies für **BSc4093**, es konnte eine, wenn auch sehr schwache, Anfärbung auf neurofibrillären Bündeln des Ammonshorn Gewebe beobachtet werden, die Färbung im Riechepithel zeigte aber eine deutliche besser Fluoreszenzintensität. In beiden Fällen war der Kontrast nicht zufriedenstellend. Dennoch kann die erzielte spezifische Affinität, wie später noch zu sehen sein wird, eventuell mit den zwei Diethylaminofunktionalitäten in Verbindung gebracht werden.

Des Weiteren wurden auch eine Reihe von über konjugierte Alkylketten mit Indolen verbrückte Benzopyrane getestet (**Tab. 05**). Die erzielten Färbeergebnisse ergaben spezifische Markierung der beiden AD-pathologischen Ablagerungen. Die beobachteten Fluoreszenzintensitäten waren allerdings relativ zu den etablierten Vergleichsfarbstoffen Thioflavin (**12**) und Methoxy-XO4 (**BSc3824**) deutlich schlechter. Der nur auf Indol-basierende verbrückte Farbstoff **BSc4443** zeigte keinerlei spezifische Färbung.

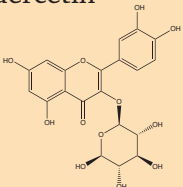
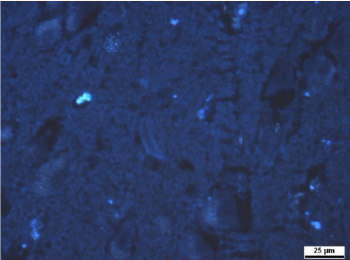
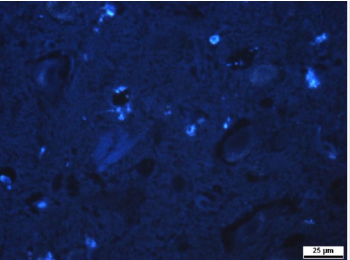
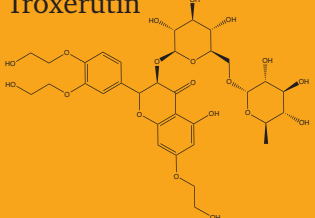
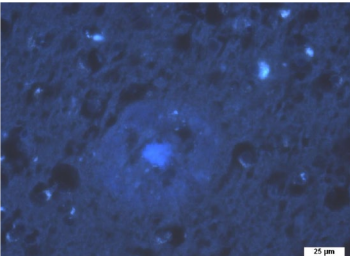
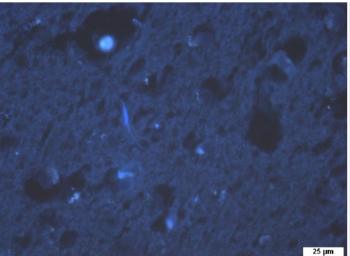
Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung Tau/Sonstiges	Anm.
BSc4092 			A β : o o o NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: o o o
BSc4093 			A β : + o o NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: + + +
BSc4094 			A β : + o o NFT: - - - wei. Beob.: rechtes Bild: Bow.: o o o; Häm.
BSc4095 			A β : + + o NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: + o o Fleecy Amyloid

Tab. 04: Die Chromen basierenden Farbstoffe in der histologischen Testung auf dem Ammonshorn. **Bsc4094** zeigte auf Nasengewebe keine AD-spezifische Färbung, dafür aber massive Hämoglobin (Häm.)-Anfärbung.

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4560 			A β : - - - NFT: + o o
BSc4561 			A β : + o o NFT: - - - wei. Beob.: best. Bereiche der Plaques
BSc4562 			A β : + o o NFT: - - -
BSc4563 			A β : - - - NFT: + o o wei. Beob.: Phbl.
BSc4564 			A β : + o o NFT: + o o
BSc4443 			A β : - - - NFT: - - -

Tab. 05: Weitere über konjugierte Alkylketten mit Indolen verbrückte Benzopyran Farbstoffe in der histologischen Testung auf den Gehirnschnitten. Ausnahme ist der Farbstoff **BSc4443**, ein ausschließlich Indol-basierter vinyl-alkyl-verbrückter Farbstoff.

Zwei bereits auf dem Markt befindliche Wirkstoffe, ebenfalls mit auf Chromen basierenden Strukturen: Isoquercetin und Troxerutin, wurden daraufhin ebenfalls getestet. (**Tab. 06**) Das Isoquercetin wird im Bereich der Kosmetikchemie als Antioxidationsmittel eingesetzt.^[106] Das Troxerutin ist ein pflanzlicher Wirkstoff, der zur Behandlung von Venenleiden für die Stabilisierung der Gefäßwände eingesetzt wird. Sie zeigten beide nur sehr schwache Fluoreszenzintensitäten auf den pathologischen Ablagerungen. Die Anfärbung war aber durchaus selektiv. Das Isoquercetin scheint eine Selektivität spezifisch für Tau-Ablagerungen zu besitzen.^[107] Das Troxerutin hingegen zeigte auf beiden Targets eine Anfärbung; interessant dabei war die Beobachtung, dass die so genannten diffusen Plaques im Vergleich zu den senilen Plaques eine bessere Markierung zeigten.

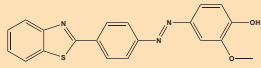
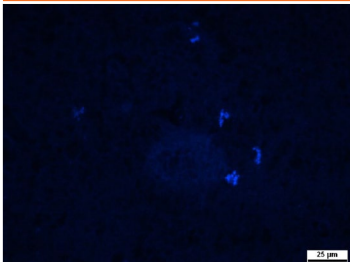
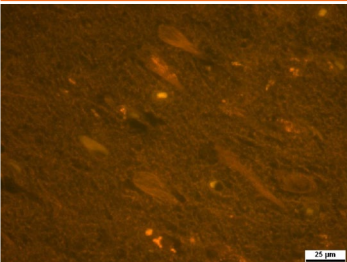

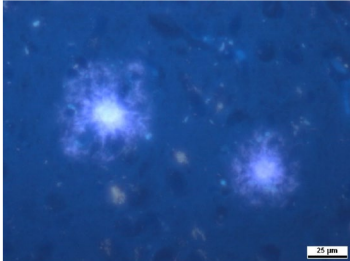
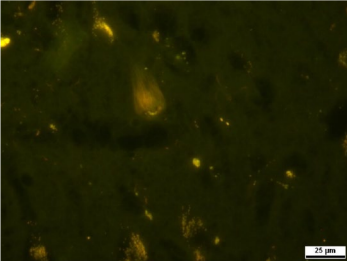
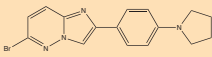
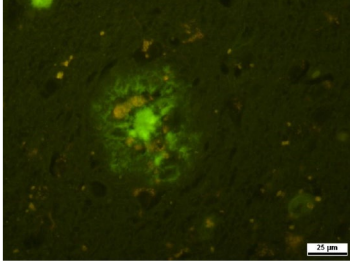
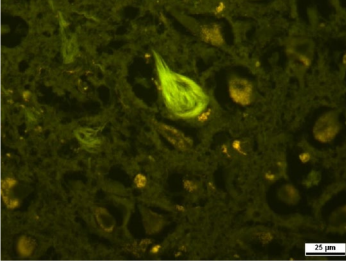
Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
Isoquercetin 			A β : - - - NFT: + o o
Troxerutin 			A β : + o o/- NFT: + o o/- wei. Beob.: diff. Plaques besser

Tab. 06: Weitere Benzopyran abgeleitete Farbstoffe in der histologischen Testung auf den Gehirnschnitten, die für kosmetische Anwendungen bereits eine Zulassung haben (Isoquercetin und Troxerutin).

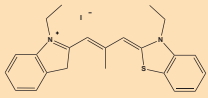
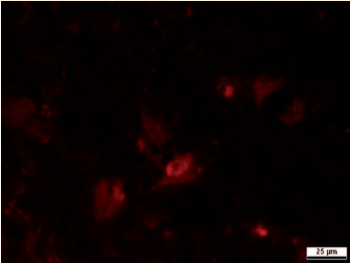
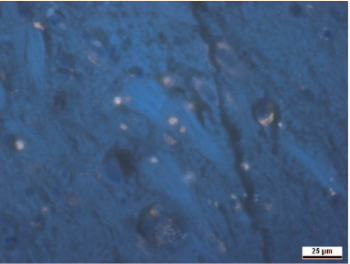
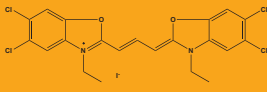
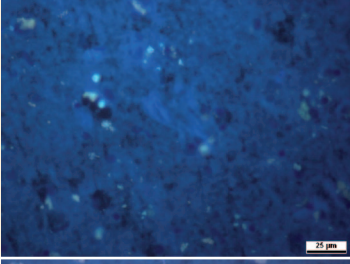
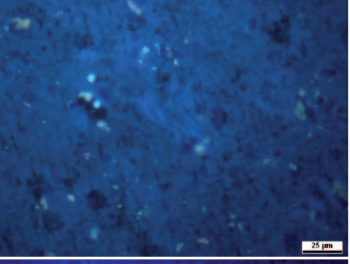
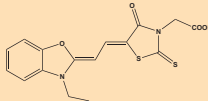
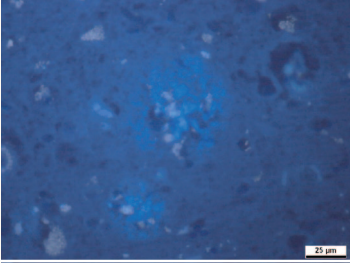
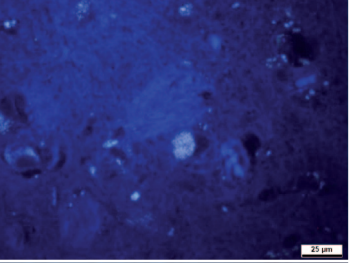
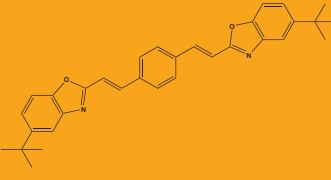
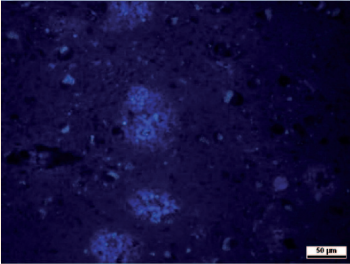
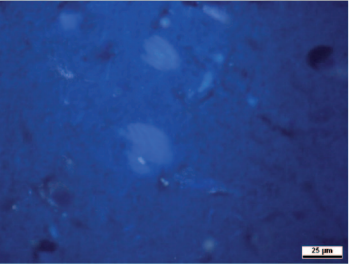
3.6.2.3 Benzooxazol-, Benzothiazol-, Imidazolpyridin- und Imidazolpyridazin-basierte Farbstoffe

Aus A β -Aggregationinhibitionsassays sind einige der folgenden Strukturen als aktive Klassen bekannt. Einige strukturell ähnliche Verbindungen finden sich dabei auch bereits bei den in der Einleitung angesprochenen PET Proben als aktive Marker. Die interessante Verbindung **BSc3814** ein Benzothiazol-abgeleiteter Farbstoff, der gute Tau-Inhibitoreigenschaften ($IC_{50} = 0.5 \mu M$; $DC_{50} = 0.3 \mu M$) aufweist, zeigte in den Anfärbeversuchen gute Affinitäten, die Fluoreszenz war allerdings für den Einsatz als entsprechende Sonde nicht ausreichend (**Tab. 07**). Auch ist aus *in vivo* Experimenten eine gewisse Toxizität strukturell verwandter Derivate bekannt.

Dagegen zeigten die mit IMPY (17) strukturell verwandten Imidazolpyridine und Imidazolpyridazine (**BSc2950/3765**) sehr gute Färbereigenschaften mit hoher Spezifität, sehr guter Fluoreszenzintensität und gutem Kontrast (**Tab. 08**). Für die Substanz **BSc4096** ähnlich der **BSc3814** wurden ebenfalls sehr gute Affinitäten zu den Targets bestimmt.^[108] Die oxaaanaloge Substanz

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc3814 			A β : + o o Tau: + + o Sonstiges:
BSc2950 			A β : + + + Tau: + + + Sonstiges: Fotobleiche
BSc3765 			A β : + + + Tau: + +* + Sonstiges:

Tab. 07: Imidazolpyridin- und Imidazolpyridazin-Farbstoffe in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten.

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4096 			A β *: - - - NFT: + o/- o/- wei. Beob.: Bow.: + + + Phbl./Häm.
BSc4447 			A β : + o o NFT: - - -
BSc4445 			A β : + o o Tau: - - - Sonstiges:
BSc4442 			A β : + + + NFT: + + + Sonstiges:

Tab. 08.: Verwandte Farbstoffe bekannter Leitstrukturen, IMPY (**16**) und IBOX (**27**), in der histologischen Testung auf den Gehirnschnitten. (*Im kompetitiven Bindungs-Assay an synthetischen A β -Fibrillen gemessene Inhibition der [3 H]PiB-(**15**)-Bindung, A β_{40} : IC $_{50}$ = 23.5 nM, K $_i$ = 19.2 nM; A β_{42} : IC $_{50}$ = > 1000 nM, K $_i$ = > 1000 nM)

BSc4447 zeigte nur schwache Färberesultate, auch wenn eine erwartete Affinität feststellbar war. Die IBOX (**27**) verwandte Struktur **BSc4445** zeigte Affinität auf A β -Ablagerungen bei nur mäßiger Fluoreszenzintensität auf dem Target. Die daraufhin getestete **BSc4442** mit einem deutlich erweiterten Chromophorensystem zeigte, wie bei der Kombination von Bisstilben und Benzoxazolen eine zu erwartende gute Affinität auf dem Target bei gleichzeitig verbesserter Fluoreszenz zu den anderen diskutierten Derivaten. Der Vergleich mit Methoxy-XO4 (**BSc3924**) ergibt aber einen deutlich schwächeren Kontrast.

3.6.2.4 Die Methoxy-XO4 (BSc3924) analogen Bisstilbenfarbstoffe und Bisstilben-derivate auf der Basis von Pyrimidin

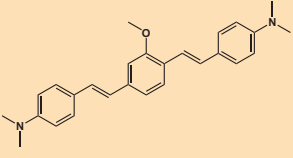
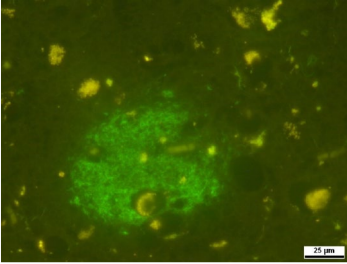
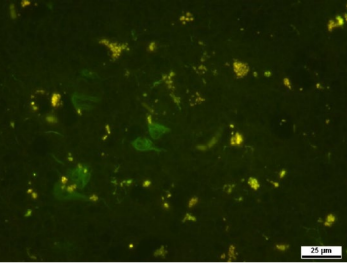
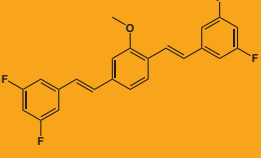
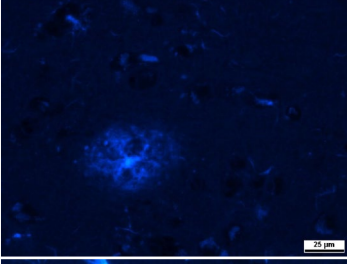
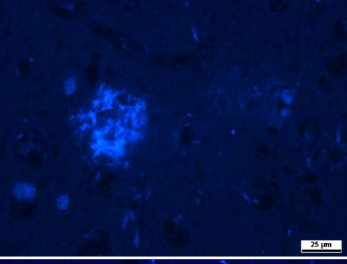
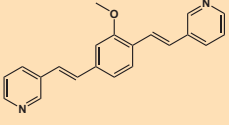
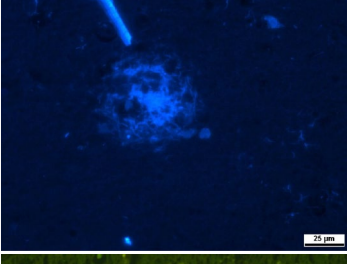
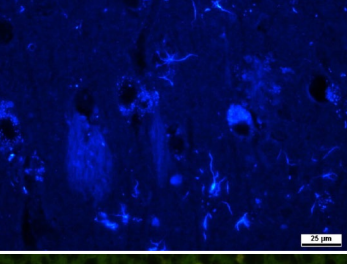
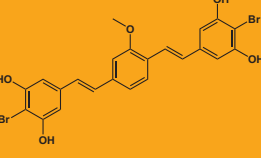
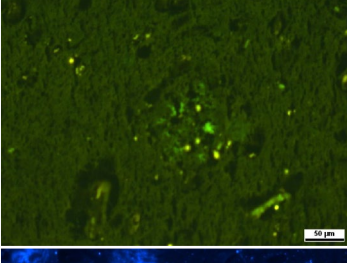
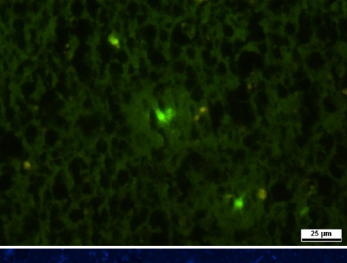
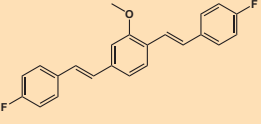
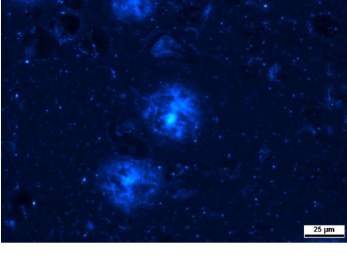
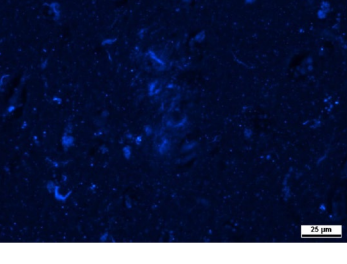
Auf der Basis des Methoxydimethylbenzols als Kern des **BSc3924** Bisstilbenfarbstoffes wurde eine Reihe von Derivaten mit unterschiedlich substituierten Aromaten in der histologischen Färbung untersucht (**Tab. 09/10**). Es wurde dabei für alle Strukturen beobachtet, dass eine selektive Anfärbung der pathologischen Merkmale der Alzheimer-Demenz erfolgt. Für einige der Verbindungen sind interessante Effekte beobachtet worden, die hier kurz diskutiert werden.

So konnte für einige der Derivate nur eine selektive Anfärbung der A β -Ablagerungen festgestellt werden (**BSc4357/4082/4184/4185**). Bei **BSc4357** konnte darüber hinaus eine Färbung von Astrozyten neben nicht gefärbten neurofibrillären Bündeln beobachtet werden. Dies ist erstaunlich, da die Astrozyten letztlich auch aus Neurofibrillen bestehen und somit die Färbung für bestimmte Tertiärstrukturen spezifisch zu sein scheint. Die Verbindung wies dabei eine sehr gute Fluoreszenzintensität mit dementsprechend hohem Kontrast auf. Diese Eigenschaften konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Sie ist aber insofern interessant, da bei Untersuchung in Mausmodellen mit kranialem Fenster über eine Astrozyten Kreuzmarkierung die Positionierung des Beobachtungsbereichs vorgenommen wird.

Für **BSc4356** wurde ein starkes Photobleichen beobachtet, wie es auch für fluorsubstituierte Farbstoffe zu erwarten ist.^[109] Die Brom-analoge Verbindung **BSc4218** hingegen war deutlich stabiler.

Die **BSc4308** hatte neben guten Färbeeigenschaften einen guten Kontrast mit guter Fluoreszenzintensität. Diese Farbstoffe konnten auch die bei AD Patienten häufig zu findenden zerebralen Angiopathien in der Blutgefäßwand anfärben. Es handelt sich dabei um krankhafte Ablagerungen von A β -Proteinen vermehrt an den Blutgefäßwänden im Gehirn. Im Tierexperiment konnte die Entstehung dieser Pathologie durch gezielte Gabe von pathogenen A β -Proteinen induziert werden. Es unterstützt somit eine später noch diskutierte Theorie einer durch äußere Einflüsse induzierten Alzheimer-Demenz.^[110]

Mit der Strukturklasse der Pyrimidin-basierten Bisstilbene wurde ein weiteres Feld hoch-affiner und fluoreszierender Farbstoffe erschlossen, (**Tab. 11-14**) die auch Basis und Teil der in Kapitel 3.5 dargelegten Patentanmeldungen sind. Ebenfalls wie die Methoxy-XO4 (**BSc3924**) Analoga haben alle Derivate der Verbindungen eine hohe Selektivität bezüglich der Targets der AD.

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4076 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: Bow.: - - - elastische fasern
BSc4184 			A β : + + o NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: - - -
BSc4358 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: Bow.: - - -
BSc4185 			A β : + o o NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: - - -
BSc4356 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: Phbl. Bow.: - - -

Tab. 09: Unterschiedlich substituierte Derivate der Methoxy-XO4 (**BSc3924**) Bisstilben Leitstruktur in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten.

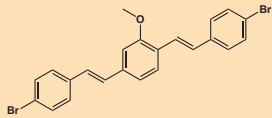
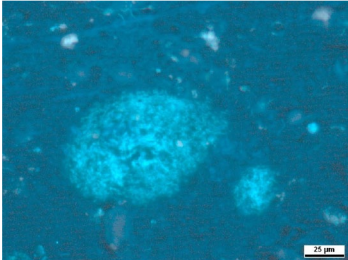
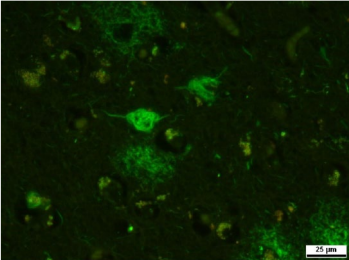
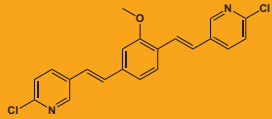
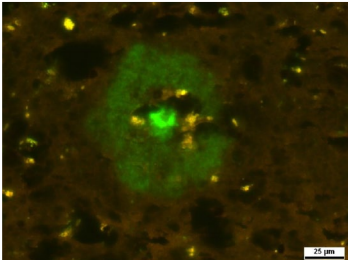
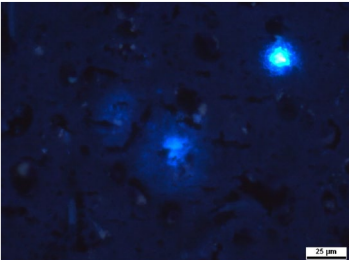
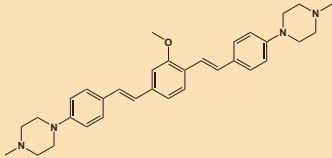
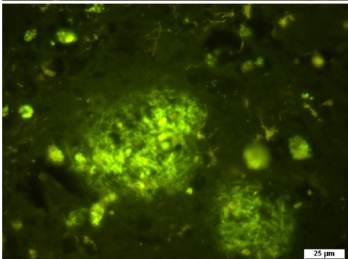
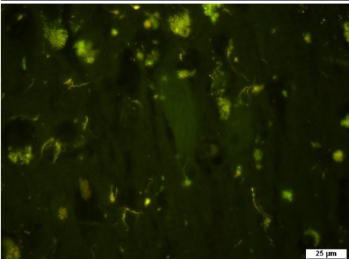
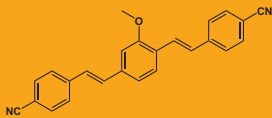
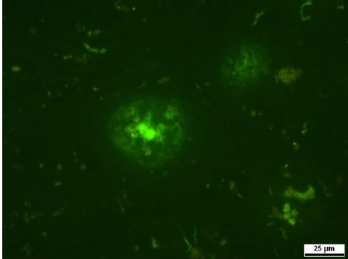
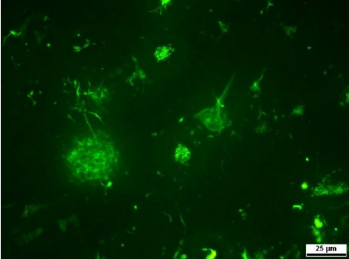
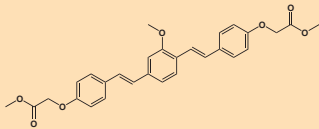
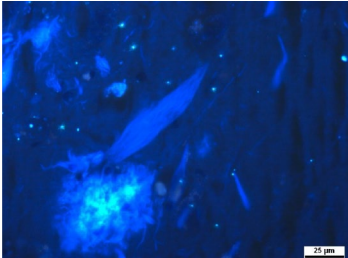
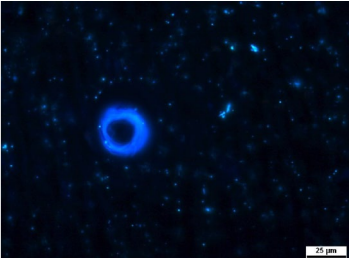
Es stellte sich dabei heraus, dass die mit Dimethylamino substituierten **BSc4090/4097** sehr gute Färbeergebnisse lieferten, speziell hinsichtlich der A β -Ablagerungen. Die Markierung der neurofibrillären Bündel war ebenfalls spezifisch aber im Falle von **BSc4097** mit etwas schlechterer Fluoreszenzintensität zu beobachten.

Die bereits in Kapitel 3.6.1 angesprochenen auftretenden Problematiken bei der Färberoutine mit neuen Farbstoffen wird bei einigen der gezeigten Derivate sehr deutlich. Im Falle des **BSc4225** zum Beispiel erwies sich die Diffusion in das Gewebe als problematisch. Der Farbstoff weist aufgrund seiner Isopropylsubstituenten ein sehr lipophiles Verhalten auf, was die gemachten Beobachtungen erklärt, dass nur eine Anfärbung der Kollagenfasern im Gewebe erfolgte.

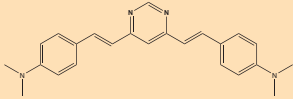
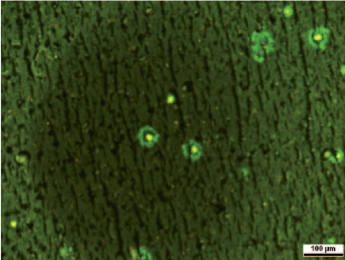
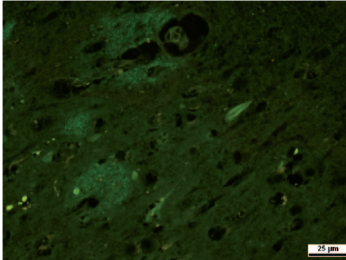
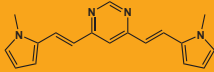
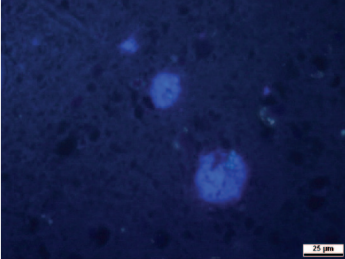
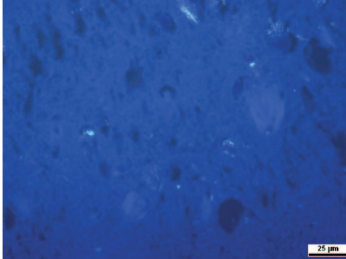
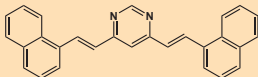
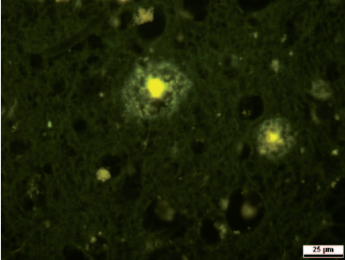
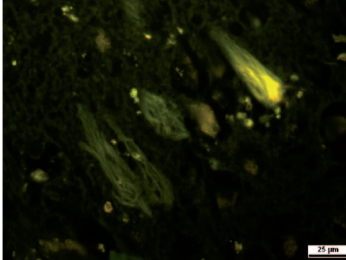
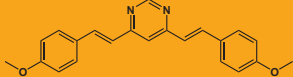
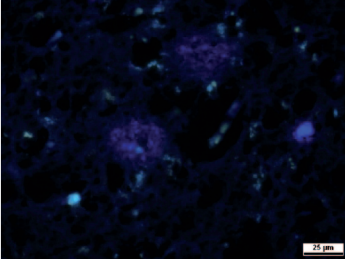
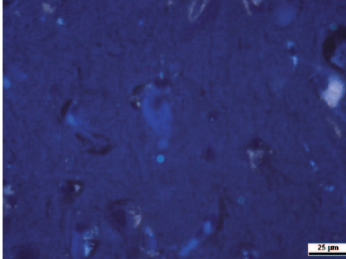
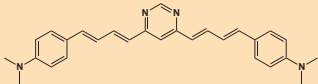
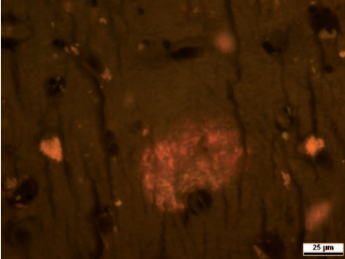
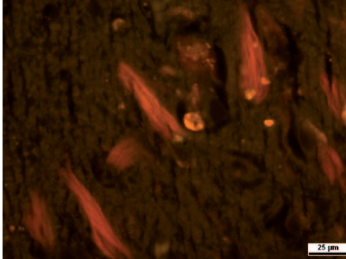
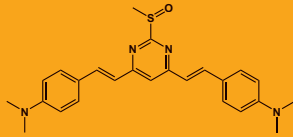
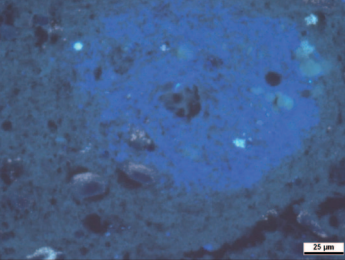
Dies ist somit vermutlich kein spezifischer Markereffekt sondern lediglich eine hydro-/lipophilie Differenzierung innerhalb des Gewebes. Der Farbstoff **BSc4328** hingegen hatte sehr gute Markierungs- und Fluoreszenzeigenschaften, was zum einen durch das entsprechend vergrößerte π -System, zum anderen eventuell durch eine andere räumliche Orientierung, an der leider zur Zeit noch nicht bekannten Bindungsstelle, resultiert.

Letztlich kann eine Auswahl eines Markers aus den gemachten Untersuchungen nicht endgültig getroffen werden, da dazu weitere Parameter herangezogen werden müssen. Dazu zählen zum Beispiel die Bioverfügbarkeit, die Quantenausbeute, die Galenik, die Stabilität *in vivo*, die Pharmakokinetik sowie Anforderungen seitens der eingesetzten Analysengeräte (s. Einleitung und Ausblick).

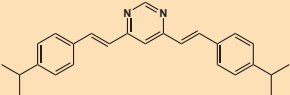
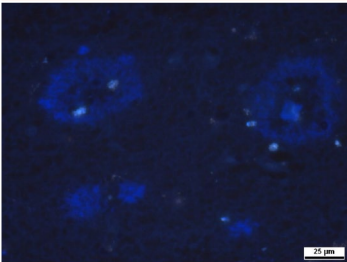
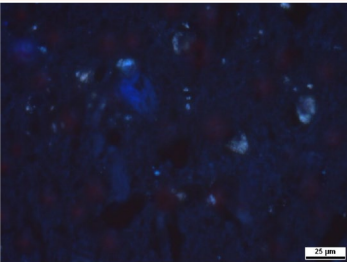
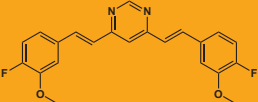
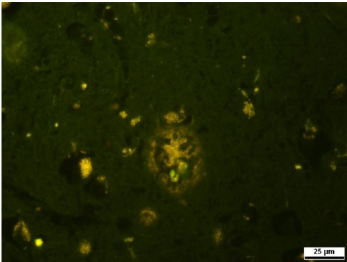
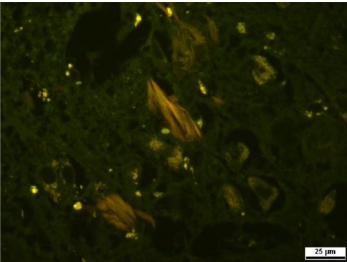
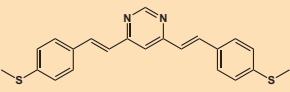
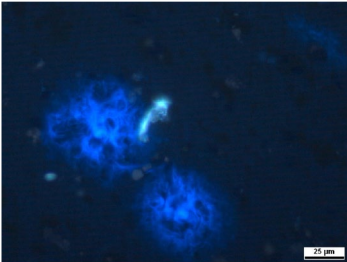
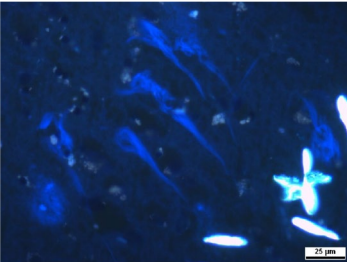
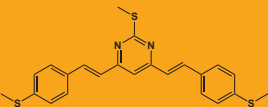
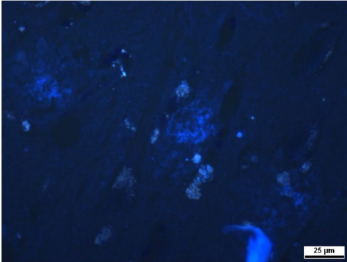
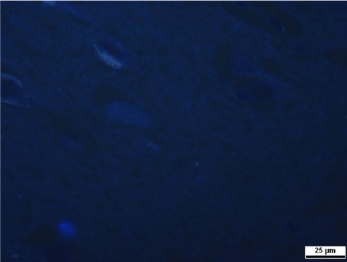
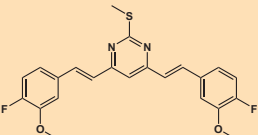
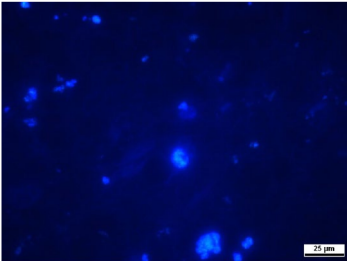
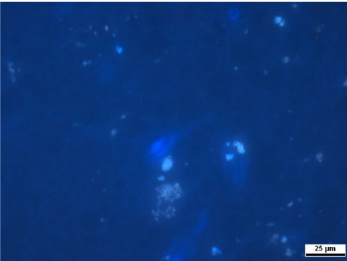
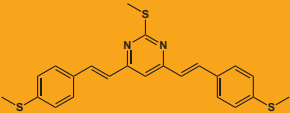
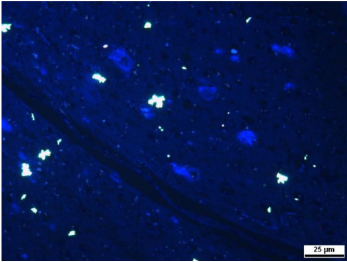
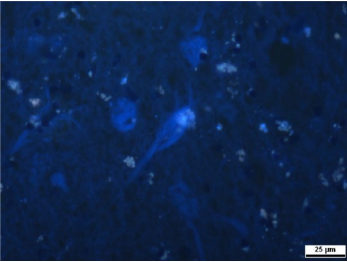
Es kann jedoch zusammenfassend festgehalten werden, dass die Strukturklasse der Pyrimidin-basierten Bisstilbene eine hoch aktive und über weitere Derivatisierungen gut zu optimierende Markerklasse darstellt. Aus der sich die derzeit sehr guten Marker **BSc4090** und **BSc4097** hervorgetan haben.

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4218 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: gewisse NFT Selektivität
BSc4082 			A β : + + + NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: + o +
BSc4357 			A β : + + + NFT: - - - wei. Beob.: Astrozyten- fortsätze gefärbt
BSc4307 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: Bow.: + + +
BSc4308 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: zerbr. Angio.

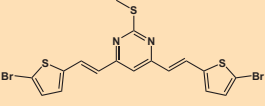
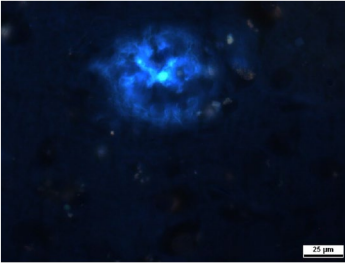
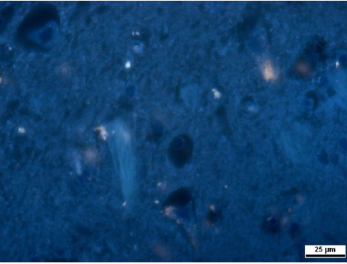
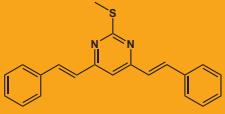
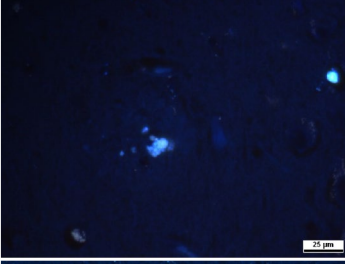
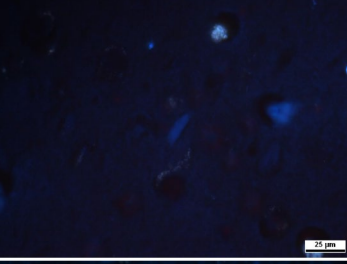
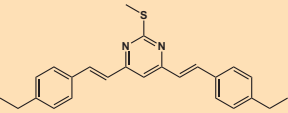
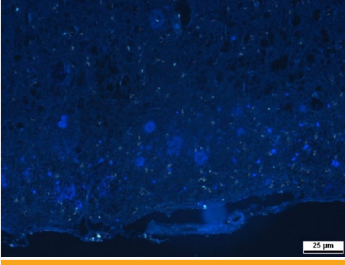
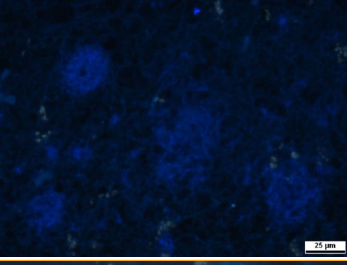
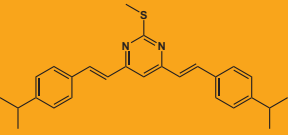


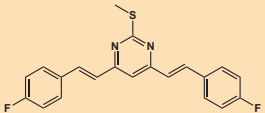
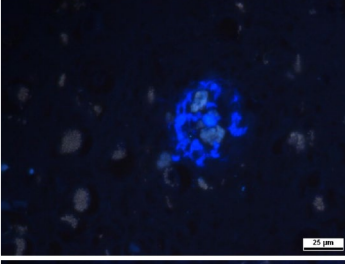
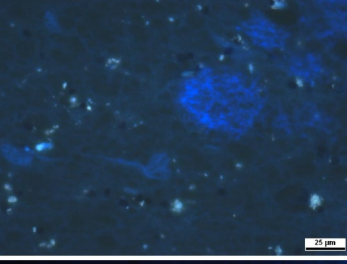
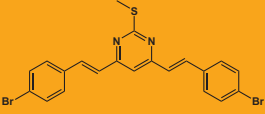
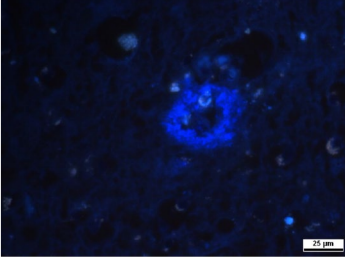
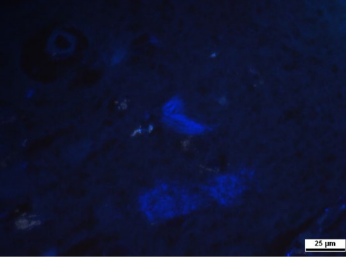
Tab. 10: Weitere unterschiedlich substituierte Derivate der Methoxy-XO4 (**BSc3924**) Bisstilben Leitstruktur in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten.

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4090 			A β^* : + + + NFT: + + + wei. Beob.: Bow: + + +
BSc4327 			A β : + + + NFT: + o/+ + wei. Beob.: Bow: + + +
BSc4328 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: zere. Angio Bow: + o o.
BSc4519 			A β : + o/- o NFT: + o/- o wei. Beob.: Phbl.
BSc4520 			A β : + + + NFT: + + +
BSc4187 			A β : + + - NFT: - - -

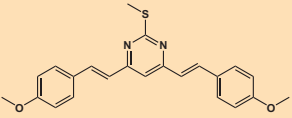
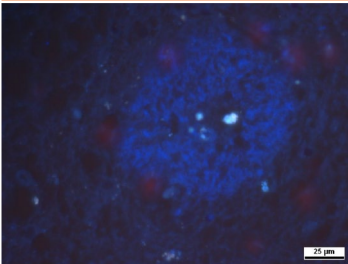
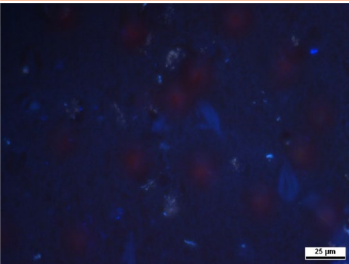
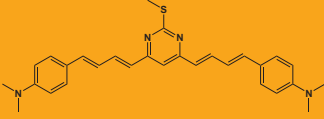
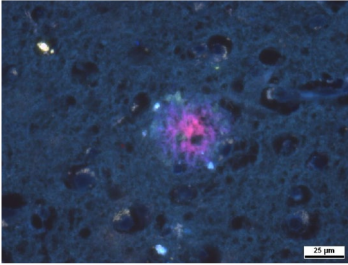
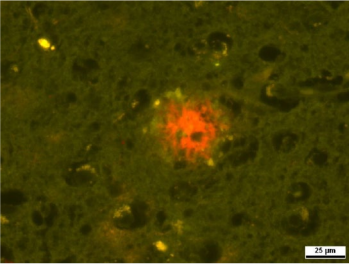
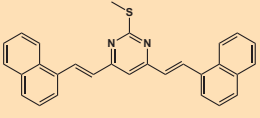
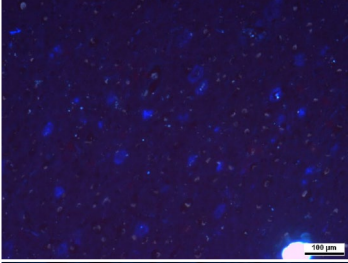
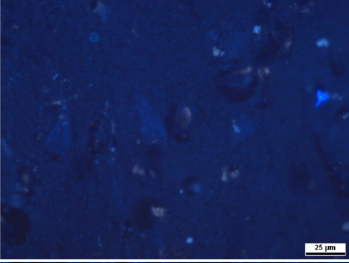
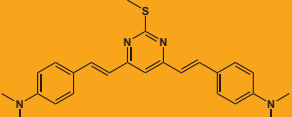
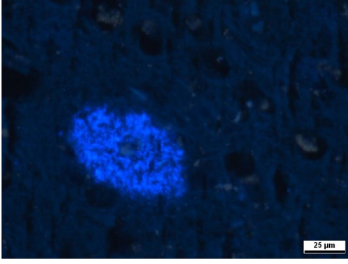
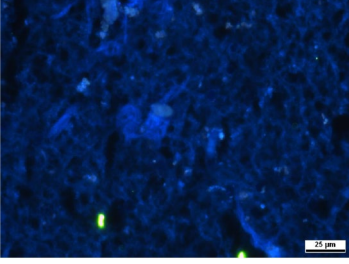
Tab. 11: Unterschiedlich substituierte Pyrimidin-basierte Bistilbene in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten (Tab. 1/4). (*Im kompetitiven Bindungs-Assay an synthetischen A β -Fibrillen gemessene Inhibition der [3 H]PiB-(15)-Bindung, A β_{40} : IC $_{50}$ = 212.7 nM, K $_i$ = 174.0 nM; A β_{42} : IC $_{50}$ = 85.2 nM, K $_i$ = 68.2 nM)

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4522 			A β : + o/- o NFT: - - -
BSc4528 			A β : + + + NFT: + + +
BSc4311 			A β : + + + NFT: + + + wei. Beob.: zere. Angio.
BSc4523 			A β : + + + NFT: - - - wei. Beob.: Bow.: - - -
BSc4524 			A β : + o/- o/- NFT: + o/- o/-
BSc4527 			A β : + + + NFT: + +/- o o

Tab. 12: Weitere unterschiedlich substituierte Pyrimidin-basierte Bisstilbene in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten (Tab. 2/4).

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4309 			A β : + o o NFT: + o o
BSc4227 			A β : + + o NFT: - - - wei. Beob.: nur Pl. kern
BSc4224 			A β : + + + NFT: - - - wei. Beob.: fleecy Amy.
BSc4225 			A β : - - - NFT: - - - wei. Beob.: collagen im Blutgefäß
BSc4228 			A β : + + + NFT: + +/o +/ o
BSc4229 			A β : + o - NFT: + o -

Tab. 13: Weitere unterschiedlich substituierte Pyrimidin-basierte Bisstilbene in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten (Tab. 3/4).

Name/Bez. Struktur	Färbung A β	Färbung NFT/Sonstiges	Anm.
BSc4226 			A β : + o +/o NFT: + o o wei. Beob.: Phbl.
BSc4223 			A β : + + + NFT: - - -
BSc4326 			A β : + + + NFT: - - - wei. Beob.: Dentrilen Fleecy Amy.
BSc4097 			A β *: + + + NFT: + o o

Tab. 14: Weitere unterschiedlich substituierte Pyrimidin-basierte Bisstilbene in der histologischen Testung auf Gehirnschnitten (Tab. 4/4). (*Im kompetitiven Bindungs-Assay an synthetischen A β -Fibrillen gemessene Inhibition der [3 H] PiB-(**15**)-Bindung, A β ₄₀: IC₅₀ = > 1000 nM, K_i = > 1000 nM; A β ₄₂: IC₅₀ = 31.7 nM, K_i = 25.4 nM)

3.6.3 Ausschluss unselektiver Färbung durch den Vergleich mit anderen ähnlichen Pathologien wie Morbus Parkinson

Die Selektivität der untersuchten Farbstoffe in Bezug auf die Pathologie der Alzheimer-Demenz ist für einen Marker ein wichtiges Kriterium. Es schließt eine unspezifische Bindung an andere Gewebemerkmale aus, wie zum Beispiel an weiße Hirnsubstanz oder die Bindung an verwandte Pathologien anderer Krankheiten, wie die Frontotemporale Demenz, Morbus Pick, die progressive supranukleäre Blickparese (PSP: *progressive supranuclear palsy*, oder Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom), die kortikobasale Degeneration (CBD) und Parkinsonismus (s. Kapitel 1.1.2). In ihrem Vorkommen sind diese anderen Tauopathien allerdings eher selten, was die Verfügbarkeit und den Zugang zu entsprechenden Gewebeproben leider stark einschränkt. Es konnte aber in der Zusammenarbeit mit dem Klinikum Darmstadt der Ausschluss beziehungsweise Einschluss von Morbus Parkinson untersucht werden.

Die Parkinson Krankheit ist ebenfalls eine langsam fortschreitende neurologische Erkrankung, ausgelöst durch einen Mangel des Neurotransmitters Dopamin, der als Folge der Krankheit das Absterben der Nervenzellen in der *Substantia nigra* (Mittelhirn) bedingt. Als pathologische Ablagerungen sind im Mittelhirn die für Morbus Parkinson typischen so genannten Lewi Körper zu finden (**Abb. 20**). Sie bestehen, wie im Falle von Alzheimer-Demenz, aus verschiedenen Proteinfragmenten, unter anderem α -Synuclein.^[111a,b,c] Für eine nachträgliche Differentialdiagnose der Parkinson-Krankheit auf histopathologischer und molekularbiologischer Ebene dient als Nachweis die Anfärbung dieser Lewi Körper mittels spezieller Antikörper. Eine Färbung

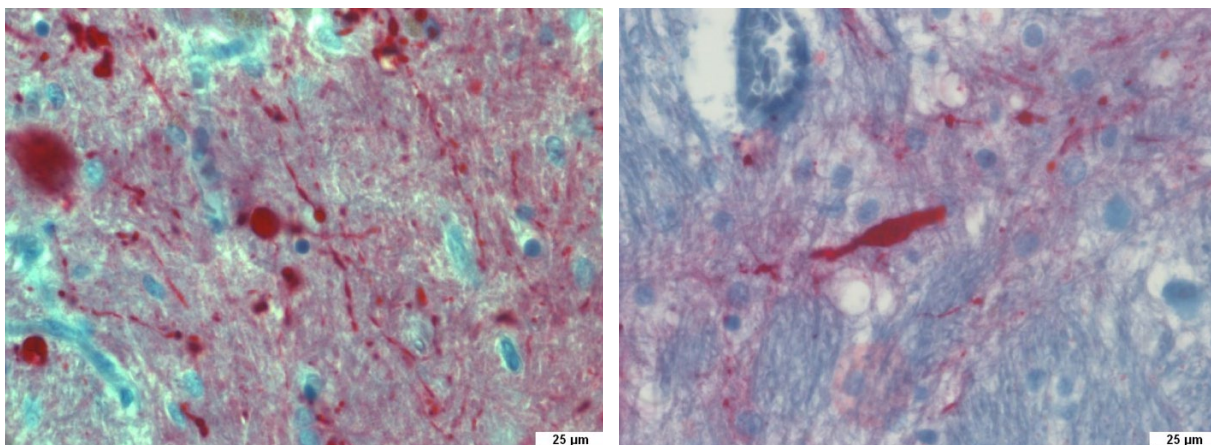


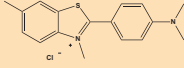
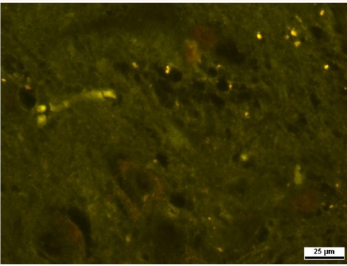
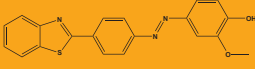
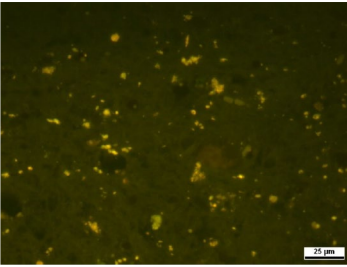
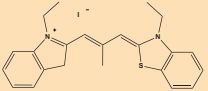
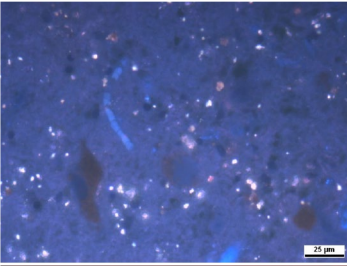
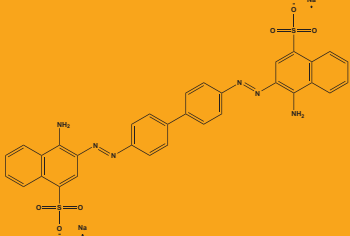
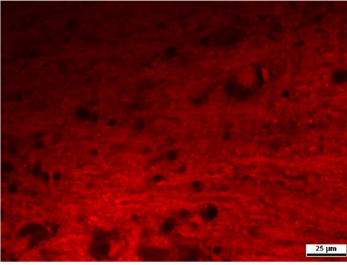
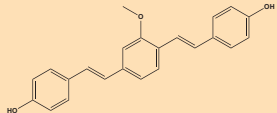
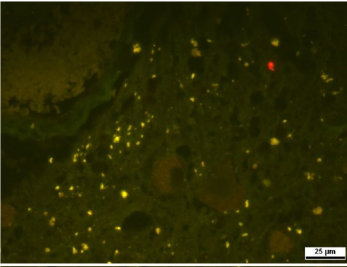
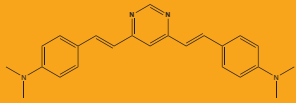
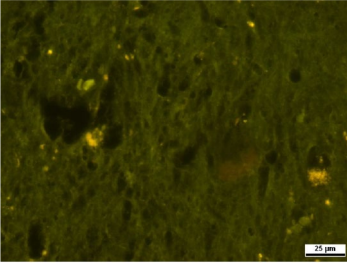
Abb. 20: Es sind die immunhistologisch rot markierten typischen Lewy-Body-Ablagerungen und die Verdickungen im Axom zu sehen. (Gewebeart: Substantia nigra, Patient: weiblich, Alter: 75 Jahre)

mit einem Fluoreszenzmarker, vergleichbar mit Thioflavin (12) bei der Alzheimer-Demenz, ist nicht etabliert. Es ist aber bekannt, dass Kongorot (13) teilweise zu einer Färbung der β -Faltblatt reichen Strukturen führt, allerdings liefern diese Färbungen nur sehr schwer reproduzierbare Ergebnisse.^[111a]

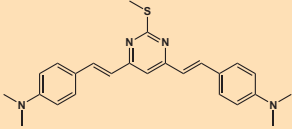
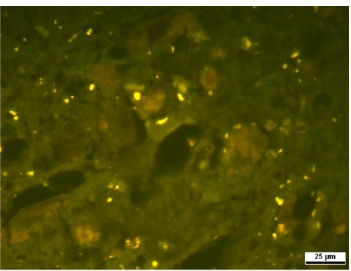
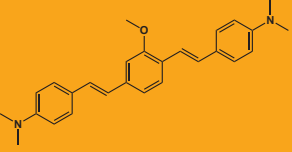
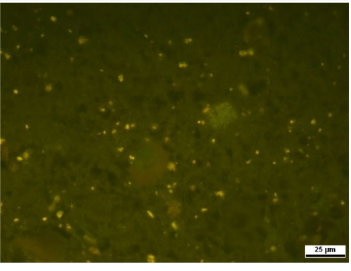
Die Untersuchung anderer Farbstoffe ist somit unter dem Aspekt des Ausschlusses unselektiver Fibrillenfärbung und unter einer eventuellen Entdeckung eines Markers für die Diagnose von Morbus Parkinson interessant. Es ist zum Beispiel für den bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Marker PIB (15) nachgewiesen worden, dass die Lewi Körper Ablagerungen nicht markiert werden.^[112]

In **Tabelle 15** sind die daraufhin untersuchten Farbstoffe aufgeführt, die zum einen A β und Tau-Proteine selektiv anfärben und zum anderen als hoch affine Substanzen bekannt sind. Die Färberoutine wurde ebenfalls, wie zuvor geschildert, in Anlehnung an das Thioflavin-Protokoll durchgeführt. Dabei konnten in wiederholten Färbekampagnen keinerlei Färbung auf den Lewi-Körpern mit den verwendeten Farbstoffen beobachtet werden (**Tab. 15**). Die teilweise auf den Gewebeschnittbildern zu sehenden leuchtenden punktförmigen Ablagerungen stammen von autofluoreszierenden Lipopigmenten.

Die Selektivität der Farbstoffe kann also in Bezug auf Alzheimer-Demenz im Vergleich zu Morbus Parkinson als spezifisch angenommen werden. Die wiederholte Färbung mit Kongorot (13) führte zu keinerlei spezifischer Gewebeanfärbung, was sich mit den in der Literatur diskutierten eher negativen Färbeergebnissen deckt. Hinweise darauf, dass eventuell Löslichkeits- oder Diffusionsprobleme für die durchweg negativen Färbeergebnisse verantwortlich waren, konnten nicht gefunden werden.

Name/Bez.	Struktur	Färbung	Bemerkungen
Thioflavin			negativ
BSc3814			negativ
BSc4096			negativ
Kongorot			negativ
BSc3924			negativ
BSc4090			negativ

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite. (Tab. 15)

BSc4097			negativ
BSc4076			negativ

Tab. 15: Es sind die verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffe aufgelistet, die Relevanz in der AD Markierung haben und auf Hirnschnitten eines Parkinson Patienten getestet worden sind (Gewebeart: Substantia nigra, Patient: weiblich, Alter: 75 Jahre).

3.6.4 Untersuchung und Färbung weiterer Gewebe mit eventueller Relevanz für die Diagnostik von Alzheimer-Demenz

Die in der Einleitung geschilderte Problematik in Zusammenhang mit Fluoreszenzdiagnostik am lebenden Patienten beinhaltet drei wesentliche Punkte:

- es muss eine entsprechende Sonde verfügbar sein,
- die zu untersuchende Pathologie muss in einer optisch erreichbaren Region liegen und
- sie muss spezifisch und möglichst quantitativ mit der Krankheit korrelieren.

Die Etablierung eines solchen Verfahrens an der Retina ist, wie vorlaufend geschildert, ein viel versprechendes Entwicklungsziel (Kapitel 3.5). Die Suche nach weiteren Gewebetypen, die nachweislich in Zusammenhang mit der Pathologie der AD stehen, ist dennoch ebenfalls von großem Interesse. Es stand leider kein Retina-Gewebe für histologische Untersuchungen zur Verfügung, jedoch konnten andere Gewebetypen untersucht werden.

3.6.4.1 Die Alzheimer-Demenz und das olfaktorische System

Aus der genaueren Betrachtung des PET-Scan Bildes in **Abb. 11** (Seite 20) geht hervor, welche für die AD typischen Hirnregionen mit Hilfe des Markers der Firma Astra Zeneca markiert werden und entsprechend pathologische Ablagerungen aufweisen. Es fällt dabei auf, dass in dem Bereich der Nase eine gewisse Positivität vorhanden zu sein scheint.

Dieser für uns initiale Hinweis wird auch von der Tatsache gestützt, dass bei AD-Patienten Einbußen des Geruchs- und Geschmacksempfindens festgestellt wurden. Es ist aus der Literatur weiterhin bekannt, dass Ablagerungen von A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln im olfaktorischen Zentrum des Gehirns zu finden sind. Die im Riechnerv und Riechepithel gefundenen Ablagerungen waren eher diffuser Natur bzw. wurden teilweise auf normale Alterungsprozesse zurückgeführt.^[113a-e]

In Zusammenarbeit mit dem Klinikum Darmstadt wollten wir diesen Hinweisen nachgehen. Die Entnahme von „Nasengewebe“ genauer, des Riechnervs und des Riechepithels werden allerdings nicht standardmäßig bei Obduktionen durchgeführt, so dass die formale Entnahme im Klinikum Darmstadt erst etabliert und eine Entnahme und spezielle Präparation eigens dafür entwickelt wurde.

Nach Überwindung und Optimierung der anfänglichen Schwierigkeiten auf Seiten der Probenentnahme und Präparation konnten Färbungen mit Thioflavin (12), **BSc4090** und weiteren aktiven Farbstoffen durchgeführt werden. Eine ausführliche Dokumentation aller Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.4.2. An dieser Stelle werden nur die für die gewonnenen Erkenntnisse wichtigen Färbungen diskutiert.

Dabei ist von besonderem Interesse, welche AD-spezifischen Ablagerungen an charakteristischen Stellen des Nasengewebes zu finden sind. Parallel zu den Fluoreszenzfärbungen wurden auch immunhistologische Untersuchungen an den entsprechenden Geweben durchgeführt. Die immunhistologischen Untersuchungen von Ammonshorn-Präparaten zeigten bestimmte charakteristische Bereiche, die mit pathogenen Tau-Proteinen belastet waren. Diese Bereiche konnten einem speziellen Drüsengewebe zugeordnet werden, den so genannten Bowman-Drüsen (**Abb. 21 B**). Die Färbungen mit Thioflavin und im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fluoreszenzfarbstoffen ergaben ebenfalls nur die selektive Färbung der Bowman-Drüsen (**Abb. 22**). Es konnten keine weiteren belastbaren spezifischen Anfärbungen beobachtet werden. Bis auf eine partielle, allerdings meist sehr schwache, unspezifische Färbung weicher Gewebeteile, darunter zum Beispiel diffuse Signale von einer Methoxy-XO4 (**BSc3924**) Färbung im Epithel (**Abb. 23**). Es konnte von immunhistologischer Seite allerdings keine Bestätigung erhalten werden, dass es sich dabei um eine relevante Anfärbung handelt.

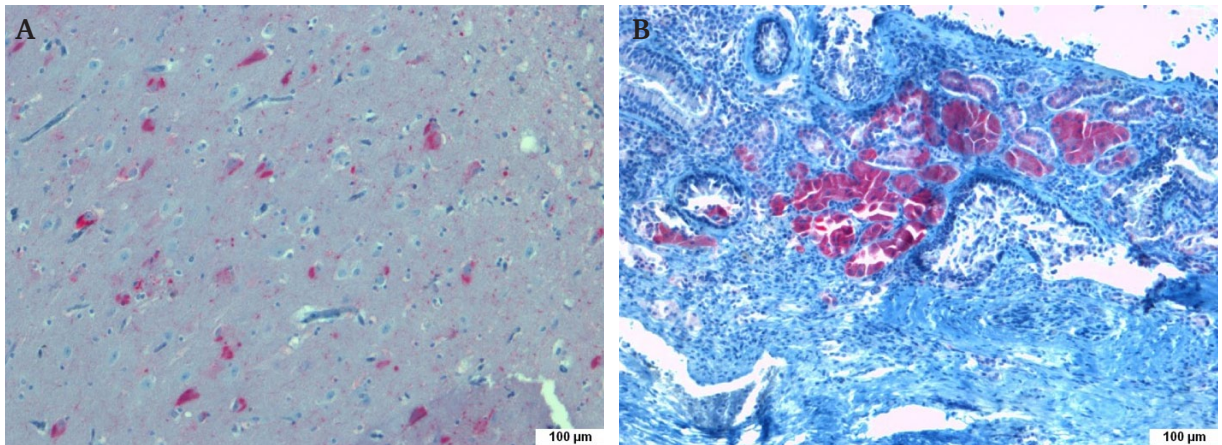


Abb. 21: **A:** Es sind die neurofibrillären Bündel der Tau-Proteinablagerungen zu sehen (Gewebeart: AH). **B:** Es sind die mit Tau-Antikörper markierten Bereiche der Bowman-Drüsen zu sehen (Patient: männlich, Alter: 89, Gewebeart: Riechschleimhaut).

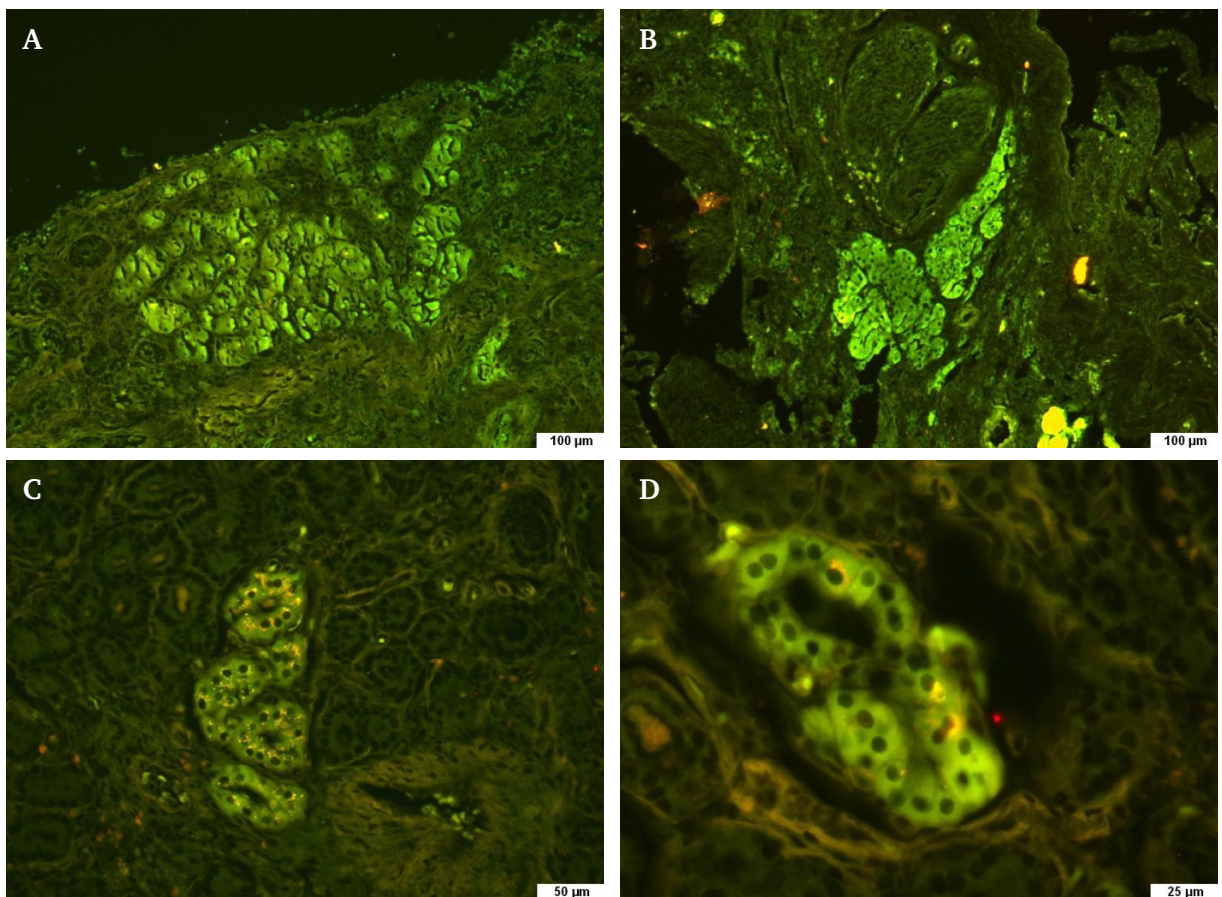


Abb. 22: **A:** Farbstoff: Thioflavin S (**12**) ; selektive Färbung der Bowman-Drüsen in der Übersicht. **B:** Farbstoff: **BSc4090**; selektive Färbung der Bowman-Drüsen in der Übersicht mit sehr guter Fluoreszenzintensität. **C&D:** Farbstoff: **BSc4223**; selektive Färbung der Bowman-Drüsen: Übersicht (**C**) und Detailaufnahme (**D**). (Gewebeart: Riechschleimhaut, Patient: männlich, Alter: 89)

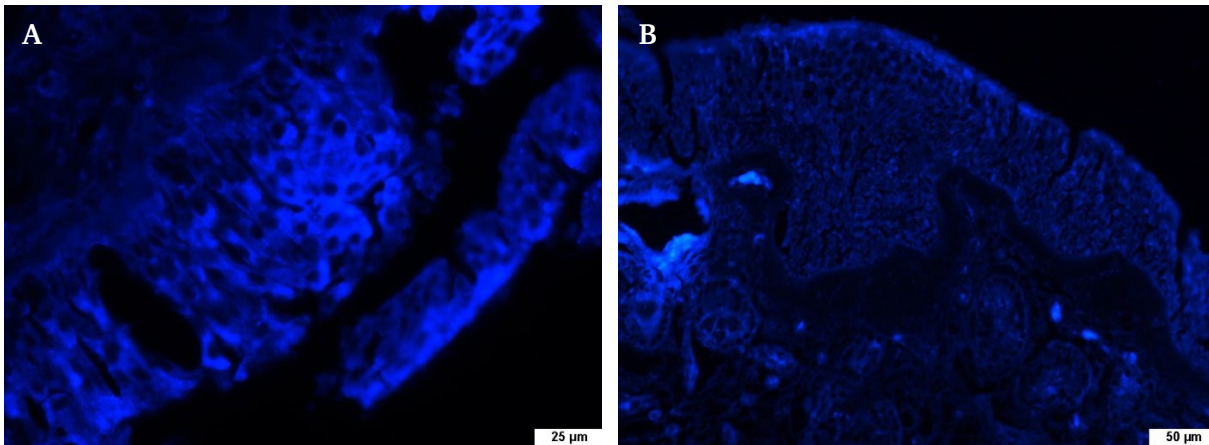


Abb. 23: Farbstoff: Methoxy-XO4 (**BSc3924**); Es sind unklare Färbung weicher Gewebe zu sehen. (Gewebeart: Riechschleimhaut, Patient: männlich, Alter: 89 Jahre)

Es muss an dieser Stelle auch nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Färbungen an diesem Gewebetyp sowie dessen Präparation in der Pathologie mit wenig Routine verbunden waren. Deshalb unterlagen die Färbungen anfangs starken Qualitätsunterschieden im Vergleich zu der jeweiligen Ammonshorn-Färbung. Diese Qualitätsschwankungen konnten aber durch eine längere Einwirkzeit, die wegen des Verdachts andere Diffusionseigenschaften des Gewebes eingeführt wurde, auf ein Minimum reduziert werden (Kapitel 4.2). Die teilweise unsteten Ergebnisse der Anfärbung am Ammonshorn im Vergleich zum Riechepithel könnten aber auch durch unterschiedliche Tau-Isoformen bedingt sein. Es konnten dazu im Rahmen dieser Arbeit aber keine abschließenden Antworten gefunden werden.

Das Methoxy-XO4-analoge Derivat **BSc4076** zeigte auf dem Ammonshorn gute Färberesultate von sowohl A β -Plaques als auch von neurofibrillären Bündeln, im Riechepithel hingegen konnte kein Tau-Protein angefärbt werden. Es erfolgte lediglich eine wenig spezifische Färbung von elastischen Fasern in den Blutgefäßen (**Abb. 24**), die auf eine zerebrale Angiopathie zurückzuführen sind. Warum somit nur A β -Proteine angefärbt wurden kann viele Ursachen haben, wie zum Beispiel eine zu geringe Konzentration an Tau-Protein im Gewebe, nicht erkannte Fehler in der Färberoutine oder das bereits andiskutierte Vorliegen anderer Tau-Isoformen.

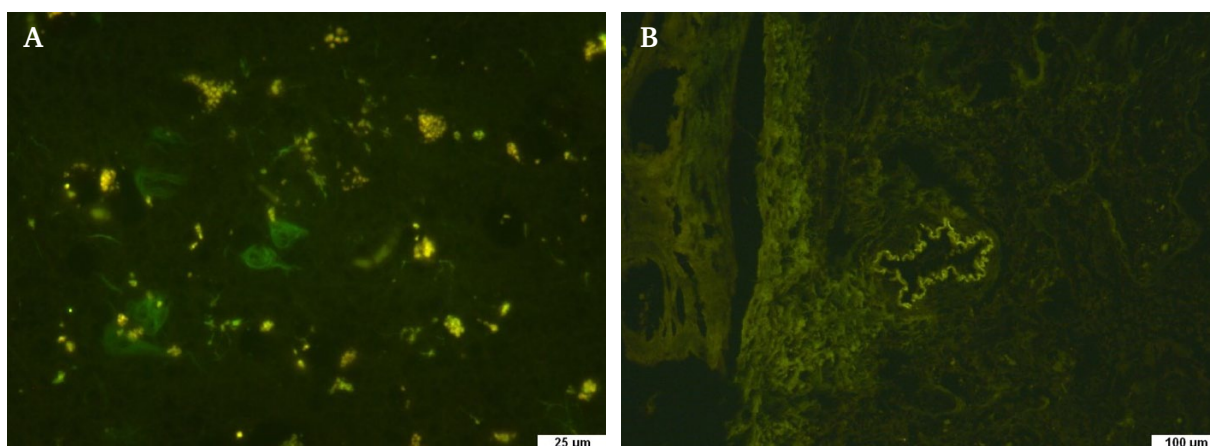


Abb. 24: Färbung mit BSc4076: A: Es sind die Tau-Fibrillen sehr gut in der Übersicht zu sehen, die granulären eher gelben Ablagerungen sind autofluoreszierenden Lipopigmenten zuzuordnen (Ammonshorn). **B:** Es ist auf den Bowmandrüsen kein Befund zu sehen, allerdings sind die Blutgefäße und die elastischen Fasern schwach gefärbt (Rieschschleimhaut, Patient: männlich, Alter: 89).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten dazu keine abschließenden Antworten gefunden werden. Es kann aber festgehalten werden, dass die Funde von Tau-Proteinablagerungen in den Bowman-Drüsen spezifisch für Alzheimer-Demenzpatienten zu sein scheinen. Die statistische Abklärung dieser Belastung im Rahmen größerer Fallzahlen und der quantitativen Bestimmung, wie viel und welche Tau-Isoformen im Epithel vorkommen, sind Fragen die noch zu klären sind. Zusammenfassend kann auf der Suche nach fluoreszenzmikroskopisch leicht zugänglichen Körperregionen, die mit dem Hirn assoziiert sind, die Nase, somit in Zukunft auch eine wichtige Rolle spielen (s. auch Kapitel 3.5.2).

3.6.4.2 Die Alzheimer-Demenz und das Intestinum

Der eigentliche Auslöser einer AD wurde, abgesehen von genetischen Ursachen, bis heute leider noch nicht aufgeklärt. Es existieren neben der anerkannten Arbeitsgrundlage der Amyloid-Hypothese und der Tau-Hypothese noch weitere teilweise umstrittenere oder auch ergänzende Hypothesen. Eine davon besagt im Kern, dass Umwelteinflüsse (z. B. Nahrung, Lebensweise, Bakterien) entscheidende Auslöser sein könnten und alle weitere Erscheinungen, wie A β - und Tau-Protein Ablagerungen, nur Folgeprozesse davon wären.^[114]

Einen Hinweis, worauf sich diese Idee stützt ist, dass die im Gehirn auftretenden A β - und Tau-Proteinfragmente auch noch an anderen Stellen im Körper überexprimiert sind. ^[115] Es finden sich zum Beispiel im Bereich des Darms A β -Ablagerungen. Im fortgeschrittenen Stadium der AD

kommt es bei den Patienten dadurch oft zu starken Einschränkungen der peristaltischen Funktion, was seitens der Pflege entsprechende Maßnahmen erfordert. Über die genaue Korrelation und Art dieser Ablagerungen ist bisher wenig bekannt auch wenn bereits einige immunhistologische Erfassungen gemacht wurden.^[116]

Die Untersuchung, ob mit den von uns synthetisierten aktiven Markern entsprechendes Gewebe angefärbt werden kann, war also naheliegend, da der Darm durch endoskopische Untersuchungsverfahren sehr gut zugänglich ist, gerade in Bezug auf eine Frühdiagnose.^[117] Die daraufhin vorgenommene Untersuchung am Klinikum Darmstadt an entsprechendem Gewebe ergab in der Immunhistologie eine scheinbare negative Korrelation der Tau-Proteinbelastung mit der AD in der Darmwand des Dickdarms (**Abb. 25, A/B**).

Versuche, mit den im Arbeitskreis Schmidt synthetisierten Farbstoffen eine Anfärbung dieses Gewebes vorzunehmen, waren leider ohne Erfolg. Die Färbungen mit den zuverlässig aktiven Verbindungen Thioflavin (**12**) und **BSc4090** zeigen weder die Anfärbung von A β noch Tau-Protein-Ablagerungen (**Abb. 25, B-E**).

Diese Thematik konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter vertieft werden, auch wenn sie ebenfalls Potential besitzt, da im Zuge von Vorsorgeuntersuchungen im Bereich Darmkrebs eine AD Prävention mit durchgeführt werden könnte. Die passenden Fluoreszenzproben und die entsprechende Korrelation mit der Krankheit müssten allerdings noch entwickelt werden.

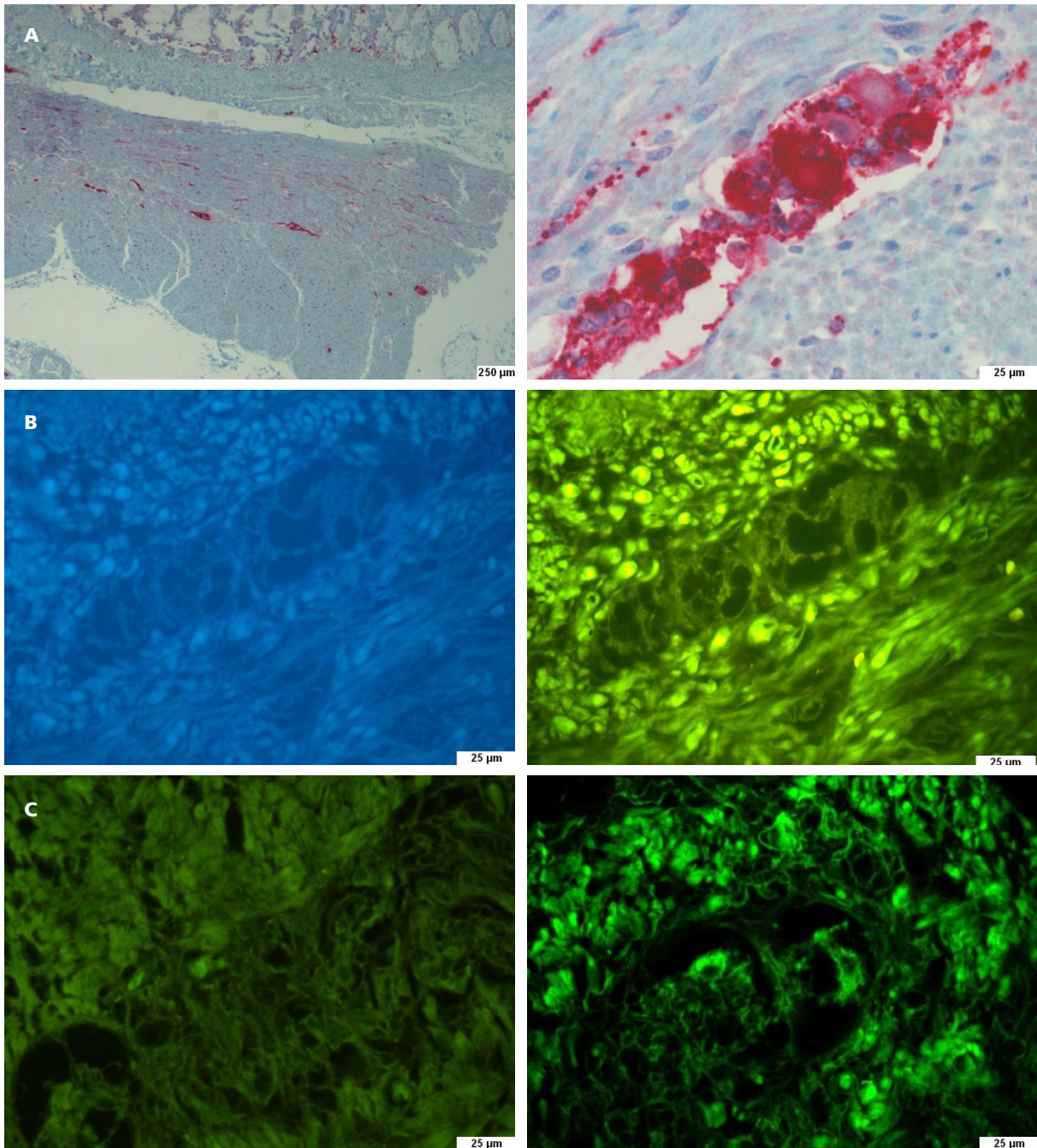


Abb. 25: **A:** Es sind die Immunhistologisch in rot gefärbten Tau-Ablagerungen in den Ganglien zu sehen. **B:** Farbstoff: **BSc4090**. Es sind keine A β oder Tau-Ablagerungen gefärbt und eine unklare Färbung in der Muskulatur zu beobachten, dabei ist viel granuläres Lipofuscin vorhanden. **C:** Farbstoff: Thioflavin (**12**), Es sind keine A β oder Tau-Ablagerungen gefärbt, nur unspezifische Färbungen weicher Gewebe. (Gewebeart: Dickdarmwand, Patient: weiblich, Alter: 78 Jahre)

3.7 Aufbau einer medium Zebrabärbling Laichproduktion für die Evaluation wichtiger Bioparameter von Substanzen.

Zebrabärblinge gehören zur Familie der Karpfenfische. Sie sind klein, robust und haben eine kurze Generationszeit. Diese und weitere Eigenschaften haben den Fisch, wie in der Einleitung geschildert, zu einem beliebten Tiermodell für z.B. Herz-Kreislauf, Tumor und Demenz Erkrankungen werden lassen. Die jeweiligen Pathologien der Krankheiten werden in transgenen Zuchtlinien erzeugt. Aber auch der Wildtyp Zebrabärbling kann als einfaches und schnelles Modell für verschiedene medizinalchemische Parameter genutzt werden, zum Beispiel Toxikologie, Bioverfügbarkeit, Mutagenität sowie als Blut-Hirn-Schranken-Modell. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Etablierung eines solchen medizinalchemischen Modells eine Fischzuchtanlage aufgebaut und für einige der hergestellten Substanzen entsprechende Untersuchungen durchgeführt.^[118, 119]

3.7.1 Aufbau der Fischbeckenanlage

Die aufgebaute und derzeit in Betrieb befindliche Anlage umfasst neun verschiedene Becken unterschiedlicher Größe und wird tierschutzkonform betrieben (Abb. 26).^[120] Die Becken sind ausgestattet mit Eheim Biopower 160 Pumpen, Standart Aquaristik Tageslicht Leuchtmitteln und werden auf 26-28°C temperiert. Die Fische werden in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Mit Ausnahmen am Wochenende werden die Fische täglich zweimal gefüttert, dabei wird das adulte Tier mit ca. 1,5-3 mg/Fisch und die Jungtiere mit ca. 0,1-0,3 mg/Fisch



Abb. 26: Die derzeit im Arbeitskreis Schmidt installierte Fischbeckenanlage in der Übersicht (von links nach rechts): 2x 60 L Standartbecken (60x30x30 cm); 2x 20 L Nanocubes™; 2x 40 L Aquabreed (40x30x25 cm), 2x 60 L Standartbecken (60x30x30 cm), 2x 10 L Nanocubes

Zierfischfutter (Tetra™) versorgt. Zusätzlich wird einmal pro Woche mit lebenden Artemien gefüttert, speziell vor Paarungen kann dies auch zweimal pro Woche erfolgen. Darüber hinaus wird die Verfütterung von tiefgefrorenen weißen und roten Mückenlarven alternativ zu den Artemien vorgenommen.

Alle die Zucht, Paarung, Fütterung und Anlage betreffenden Ereignisse werden in einem digitalen Protokoll auf Basis einer Exceltabelle erfasst.

Der nach Nüsslein-Vollhardt vorgeschlagene Einsatz von demineralisiertem Wasser mit anschließendem Zusatz von Salzen wurde nach Überprüfung der örtlichen Wasserdaten auf normales Leitungswasser umgestellt, da die enthaltenen Salzkonzentrationen ähnliche Werte aufweisen.

[121, 119] Eine konstante Wasserqualität wird durch wöchentliche Teilwasserwechsel und stetige Beckenreinigung erreicht. Wichtig ist es dabei, das nicht gefressene Futter regelmäßig und konsequent zu entfernen. Alle eingesetzten Tiere sind Wildtypen und stammen aus dem örtlichen Fachhandel. Nach Erwerb wurden die Fische für jeweils eine Woche in Quarantäne gehalten und anschließend in nach Geschlecht getrennte Becken sortiert.

3.7.2 Nachzucht und Laichgewinnung vom Zebrabärbling

Generell hat der Zebrabärbling die Geschlechtsreife nach etwa 16 Wochen erreicht, das bedeutet je nach Stadium der eingekauften Tiere kann auch erst dann das Geschlecht eindeutig bestimmt werden und eine getrennte Haltung erfolgen. Dies gilt natürlich auch für die eigenen Nachzuchten. Bis zu der Separation wurden die Fische entsprechend in Gemeinschaftsbecken gehalten.

Für eine erfolgreiche Laichgewinnung ist eine Geschlechtertrennung im Vorfeld essentiell, weil sonst die Eiablage naturgemäß im Gemeinschaftsbecken erfolgen würde. Dies muss vermieden werden, da der Zebrabärbling ein Laichräuber ist. Darüber hinaus ist die Kontrolle über das Zeitfenster der Eiablage unter solchen Bedingungen schwer zu beeinflussen. Dieses Szenario wird durch die Verwendung spezieller Zuchtgefäße, die diesen Laichraub durch entsprechende Abtrennungen der Fischpaare von ihrem Laich vorsehen, vermieden und man kann damit gleichzeitig den Zeitrahmen für die Eiablage bestimmen. Der Aufbau und Ablauf in einer solchen speziellen Ablauchkammer ist im Prinzip gleich: Es werden ein Weibchen und ein Männchen am Abend vorher in eine entsprechende Laichkammer, die mit einer Kunststoffpflanze als Deckung ausgestattet ist, zusammengesetzt. In den frühen Morgenstunden des Folgetages

kommt es dann naturgemäß zur Eiablage des Weibchens und der Befruchtung durch das Männchen. Nach Zurücksetzen der Fische in ihre jeweiligen Becken kann der Laich eingesammelt und für Nachzucht von Fischen oder für Experimente verwendet werden. Neben diesem natürlichen Weg der Laichgewinnung gibt es auch die Option, die Eier und den Samen auszumassieren, was allerdings in unserer Praxis keine Rolle spielte.^[119] Es wurden verschiedene Laichkammern, die am Markt in diversen Bauarten erhältlich sind, ausprobiert und mit den nachfolgend geschilderten Ergebnissen evaluiert.

Es kamen dabei folgende Modelle zum Einsatz: Guppylaichbehälter, Zuchteinhängebecken der Firma Hobby Modell Nido II, Aquabreedbecken™ und Zuchtbehälter der Firma Aquatic Habitats® (**Abb. 27**). Aufgrund der niedrigen Anschaffungskosten und der schnellen Verfügbarkeit wurden mit einem Filterpapiereinsatz modifizierte Guppykästen verwendet. Die erzielten Laicherfolge waren in Bezug auf erhaltene Menge und Qualität des Laichs durchschnittlich mit jeweils etwa 120 Eiern pro Paarung.



Abb. 27: Die getesteten Abblanchbehälter im Überblick modifizierte Guppylaichbehälter (**A**), Zuchteinhängebecken der Firma Hobby Modell Nido II (**B**), speziell Aquabreedbecken (**C**) und Zebrabärblingszuchtbehälter der Firma Aquatic Habitats® (**D**).

Als Nachteil erwies sich der konisch geschlitzte Einsatz des Guppiekastens, der die Fischkammer vom Laichbereich abtrennte, da die Spaltbreite zu groß war, so dass es den meist dünneren Männchen gelang, hindurchzuschlüpfen und den Laich zu fressen. Auch gestaltete sich das Einfangen der Fische wegen der Form der Kammer und der schwimmenden Betriebsweise schwierig und war dadurch mit Stress für die Fische verbunden.

Die Zuchteinhängebecken Nido II führten nach kleinen Modifikationen ebenfalls zu vergleichbaren Laicherfolgen. Sie hatten den Vorteil, dass sie mit zwei Kammern und einer Verankerung am Beckenrand ausgestattet sind, so dass ein eventuelles Kentern verhindert wird. Die zu große Maschenweite des Siebbodeneinsatzes erwies sich allerdings als Nachteil, da beim Ein- und Rücksetzen, getrieben durch den Fluchtinstinkt, die Fische sich durch diesen zwängten und damit den Laich gefährdeten. Wenn dies bereits beim Einsetzen erfolgte, mussten alle Fische nochmals entnommen, der durchgeschlüpfte Fisch befreit und dann alle erneut eingesetzt werden, was ebenfalls mit Stress für die Tiere und damit meist schlechteren Laichergebnissen verbunden war. Dieses Problem konnte durch einen Drahteinsatz engerer Maschenweite (2mm) gelöst werden.

In beiden Varianten der schwimmenden Laichkästen entstanden beim Hantieren in der Kammer bauartbedingt Strömungen. Das war zum einen ein Nachteil, da die Fischeier dadurch aufgewirbelt wurden und dann von den noch eventuell im Behälter befindlichen Fischen gefressen werden konnten. Zum anderen war es aber auch ein Vorteil, da die Eier so besser zusammengetrieben und dann eingesammelt werden konnten.

Die Installation und Inbetriebnahme der speziellen *Aquabreed* Aufzuchtbecken erwies sich leider von allen Varianten als die für unsere Zwecke nicht hinreichend geeignete. Die Bauart dieser speziellen Becken ist dafür ausgelegt, die Eiablage und die anschließende Aufzucht der Larven in einem Becken durchzuführen, dafür ist das Becken mit Siebboden und Schwammfilter ausgestattet (**Abb. 27, C**).

Bei erfolgreicher Paarung und Laichablage sind die Eier auf dem darunterliegenden schräg eingelegten Glaszwischenboden zu finden, die Elternfische werden entnommen und die Eier können bis zum Jungtierstadium versorgt und herangezogen werden. Leider war die Überlebensrate der befruchteten Eier im Vergleich zu den anderen Laichkammern sehr schlecht. Auch das

Einsammeln der Eier für eine Verwendung in Experimenten erwies sich als problematisch. Das in den anderen Fällen mögliche vorsichtige Einsammeln mit einer Pipette war wegen der großen Fläche, über die sich die Eier verteilten, sehr ineffizient. Das daraufhin durchgeführte Absaugen und Filtern war zwar effizient, ging aber mit Verlusten durch mechanische Beschädigungen der Eier einher. Die beim Aufsaugen mitgenommenen vergleichsweise größeren Mengen an Verschmutzungen, meist Kot oder Futterreste, mussten anschließend ebenfalls wieder vom Laich isoliert werden. Trotz sorgfältiger Abtrennung dieser Verschmutzungen und Waschen des Laichs war die Überlebensrate des so erhaltenen Laichs geringer als bei den anderen Laichkammern.

Der Einbau eines V-gekanteten Edelstahlblechs erleichterte zwar die Laicheinsammlung blieb aber mit den anderen erwähnten Nachteilen verknüpft (**Abb. 28**). Des Weiteren war der vom Hersteller gelieferte Siebboden zu weitmaschig konzipiert und musste durch einen Siebboden aus Edelstahl mit engerem Lochdurchmesser (2 mm) ersetzt werden.

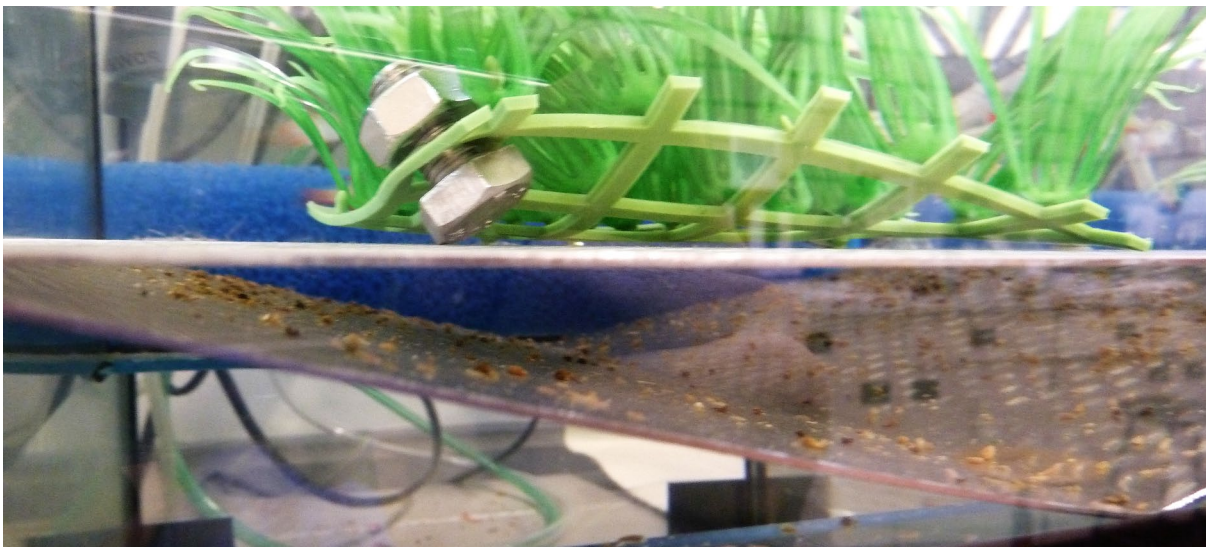


Abb. 28: Die modifizierten Aquabreedeinsätze im Detail: gerades Blech ist der Siebboden unten ist des V-Gekantetes Edelstahlbodenblech.

Der letzte der getesteten Laichbehälter der Firma Aquatic bestehend aus einer kleinen Wanne, passendem Einsatz mit feinmaschigem Siebboden, einer Trennzwischenwand und einer Abdeckung, hat den Vorteil, dass er auf die Dimensionen des Zebrabärbling abgestimmt ist und für jedes Fischpaar ein autarkes Umfeld bereit stellt (**Abb. 27, D**). Die Trennzwischenwand, die laut Herstellerempfehlung erst am Morgen nach dem Zusammensetzen des Pärchens für einen

besseren Eingewöhnungsprozess entfernt werden soll, ergab in unseren Experimenten keine signifikante Verbesserung oder Verschlechterung des Laichergebnisses. Das Ein- und Rücksetzen der Fische war wegen der Behältergröße einfach und für die Fische stressfrei vorzunehmen. Im Anschluss war der Laich nach Entnahme der eingesetzten Wanne schnell abzutrennen und für Versuche nutzbar. Einzig der fehlenden Temperierung des Systems musste bei Bedarf durch einen Heizstab Abhilfe geleistet werden. Damit erwiesen sich diese Laichkontainer als die zweckmäßigsten aller getesteten Behälter.

Der so erhaltene Laich konnte dann je nach Verwendungszweck weiter verarbeitet werden. Dazu wurden zuvor die Verunreinigungen, wie unbefruchtete oder mechanisch verletzte Eier sowie Kot und Schuppen aussortiert, und der Laich danach mit Wasser gewaschen und über einem E2 oder E3 Embryo Medium (definierte Salzlösung mit Antibiotika) gelagert.^[119, 121] Dies geschah bis spätestens 3 h nach Befruchtung (hpf, *hours post fertilization*). Für den Verwendungszweck der Nachzucht wurde er in Chargen von 20-30 Eiern unterteilt und in E2 Embryo Medium bei 28 °C inkubiert. Nach einer 72-stündigen Inkubation wurden die geschlüpften Larven in eines der größeren Becken (Nano® 10 L/20 L) überführt und bis zur Geschlechtsreife herangezogen. Für die Verwendung in Experimenten wurde der Laich zu je zehn Eiern in eine 24 x 1.5 ml *well plate* sortiert und mit jeweils 1 mL E2- oder E3-Medium versetzt und bei 28°C inkubiert.

3.7.3 Der Laich des Zebrafärblings in Experimenten mit fluoreszierenden Farbstoffen

Der gewonnene und vorbehandelte Laich konnte nun für Experimente verwendet werden. Für die Untersuchung der fluoreszierenden Farbstoffe wurde der Laich 24 hpf (*hours post fertilization*) mit der zu testenden Substanz für 24 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte an den zwei Folgetagen 48-50 hpf und 70-72 hpf. Im Anschluss wurden die Tiere mit einer Überdosis Tricaine getötet und über Formalinlösung im Kühlschrank gelagert.

Die Farbstoffe wurden in DMSO-Stammlösungen formuliert und den Kammern der 24 x 1.5 *well plates* entsprechend zudosiert (**Abb. 29**).

Die Auswertung erfolgte unter Stereolupe und Mikroskop. Es wurden dabei morphologische Veränderungen und weitere Auffälligkeiten, die eventuelle Rückschlüsse über die Aufnahme und Verteilung des Farbstoffes im Zebrafärbling geben, sowie der Fluchtreflex als Indikator einer normalen Entwicklung untersucht. Dieses Verfahren orientiert sich damit zum Teil an dem so

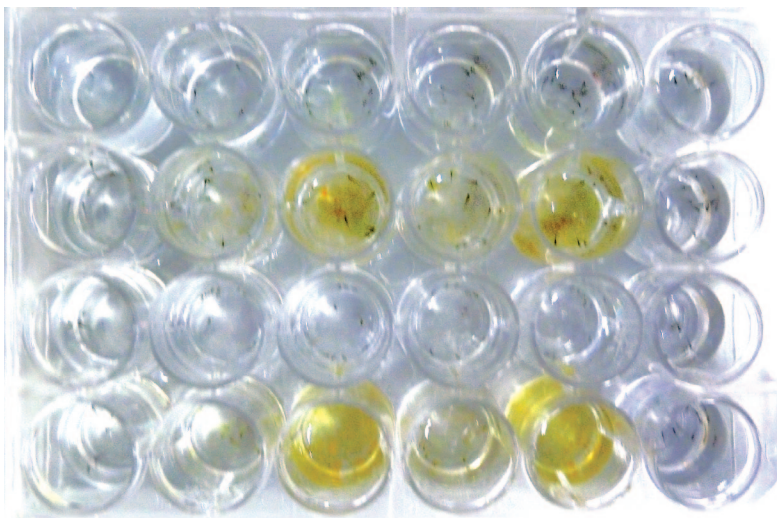


Abb. 29: Übersicht einer 24 x 1.5 well plate mit Larven und Farbstoffen bestückt.

genannten DarT Assay für Substanztoxikologie.^[123] Allerdings war die Entwicklungsidee der von uns durchgeführten Testungen neben der Erhebung von toxikologischen Hinweisen weitergehend in Bezug auf die fluoreszierenden Marker. Dabei soll mit Hilfe dieses Modells gleichzeitig eine Aussage über die Aufnahme und Verteilung des fluoreszierenden Farbstoffes gemacht werden, was so in dieser Form noch nicht bekannt ist.

Es ist allerdings bekannt, dass bereits im frühen Larvenstadium ab dem 3 dpf (*day post fertilisation*) die Larve über eine Art Blut-Hirn-Schranke verfügt.^[98] Inwieweit daraus Rückschlüsse für die Weiterentwicklung fluoreszierender Sonden gezogen werden können, sollten erste Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit klären.

3.7.3.1 Versuche mit fluoreszierenden Farbstoffen am Laich des Zebrafährblings

Es wurden für erste Versuche eine Auswahl an Farbstoffen mit bekannter Fluoreszenz und bekannter histologischer Affinität zu den Targets der Alzheimer-Demenz untersucht (**Abb. 30**). Die Ermittlung von toxikologischen Daten aus diesen Versuchen gestaltete sich allerdings als schwierig. Denn das durchweg essentielle Problem der fluoreszierenden Farbstoffe war ihre äußerst schlechte Löslichkeit in Wasser. Bedingt dadurch kam es nach Zugabe der DMSO-Farbstoffstammlösung, teilweise verzögert, zum Ausfallen von Substanz aus dem wässrigen Embryo-Medium. Dadurch waren die eingestellten Konzentrationen nicht mehr mit dem wirklich erreichten Wert gleichzusetzen, von einer konzentrationsabhängigen Toxikologie wurde deshalb abgesehen (**Tab. 16**).

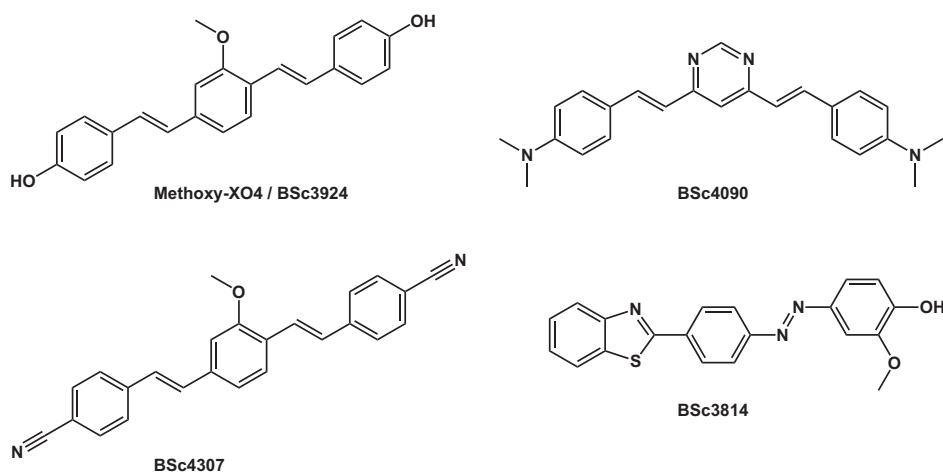


Abb. 30: Die für die Experimente mit dem Laich verwendeten fluoreszierenden Marker.

Name/ Bez.	nach 24h Entwicklung Überlebensrate	nach 48h (1 µM) Entwicklung Überlebensrate Fluchtreflex	nach 48h (10 µM) Entwicklung Überlebensrate Fluchtreflex	nach 72h (1 µM) Entwicklung Überlebensrate Fluchtreflex	nach 72h (10 µM) Entwicklung Überlebensrate Fluchtreflex	Beobachtungen
DMSO Kontrolle (1/10 µM)	normal 100%	normal 100% normal	normal 100% normal	normal 100% normal	normal 100% normal	keine Auffälligkeiten
Me-XO4 / BSc3924	normal 100%	gestört 95% vorhanden	gestört 95% vorhanden	gestört 95% vorhanden	gestört 95% vorhanden	Starke Rückgrat-Krümmung, Farbstoff teilweise im leeren Chorin zu sehen
BSc4090	normal 100%	normal 100% vorhanden	normal 100% vorhanden	normal 100% vorhanden	normal 100% vorhanden	Kopfwinkel etwas hinter der Entwicklung Larven haben den Farbstoff aufgenommen vor allem im Dottersack
BSc4307	normal 100%	verzögert 100% negativ	verzögert 100% negativ	verzögert 100% vorhanden	verzögert 100% vorhanden	Larven sind auf einem ~ 40 hpf Stadium stehen geblieben
BSc3814	normal 100%	gestört 100% vorhanden	gestört 0% negativ	gestört 100% vorhanden	gestört 0% negativ	Substanz ist ausgefallen Larven sind gefärbt; überwiegend Schwanzende gekrümmt; leichte Rückgrat-Krümmung

Tab. 16: Beobachtungen und Hinweise eventueller toxikologisch relevanter Einflüsse der bei zwei Konzentrationen getesteten Farbstoffe gegen die DMSO Kontrolle. Die zu den **BSc**-Nummern gehörenden Strukturen sind in **Abb. 30** abgebildet.

Die Abfrage des interessanten Bezugs einer bestimmten Verteilung oder Aufnahme konnte hingegen mikroskopisch trotz der unklaren Konzentrationen angegangen werden. Die erste augenscheinliche Beobachtung war dabei die Aufnahme des Farbstoffes von einigen der Larven, trotz teilweise massiver Bodensatzbildung. Die Larven waren komplett eingefärbt, wie unter der Stereolupe deutlich zu erkennen. (**Abb. 31, A**) Teilweise waren auch die nach dem Schlüpfen der Larve zurückbleibenden Chorionhüllen stark eingefärbt. Des Weiteren ist die negative Rückgrat-Krümmung der Larven ein ebenfalls auffälliges Merkmal (**Abb. 31, B**).

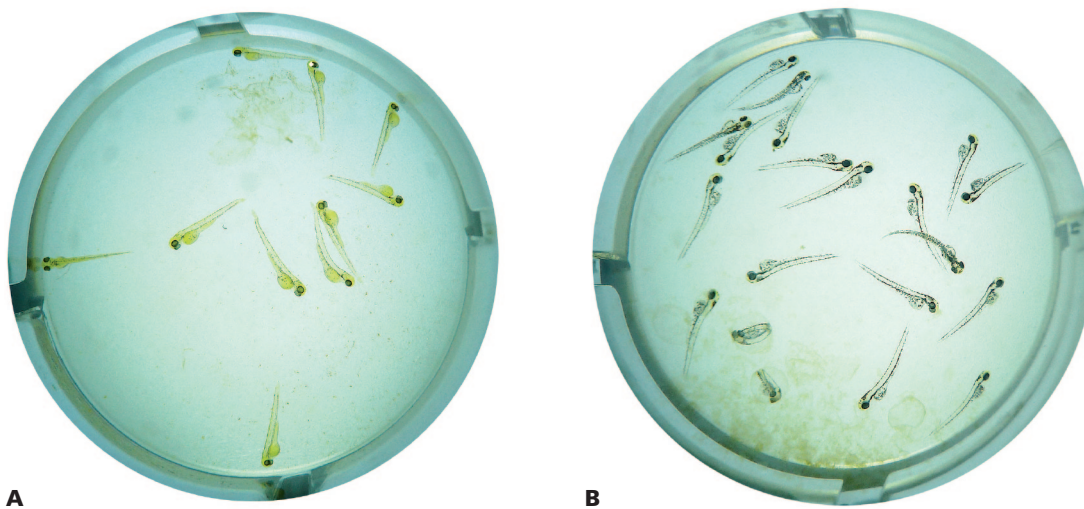


Abb. 31: **A:** Mit **Bsc3824** (10 μ M) gefärbte Larven beobachtet 48 hpf; **B:** Mit **BSc3924** (10 μ M) gefärbte Larven deutlich zu erkennen sind die Rückgratverkrümmungen, die gefärbten Chorionreste sowie teilweise die Larven.

Die detaillierte Betrachtung der Larven unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte allerdings keinerlei sauber zu separierenden Signale von Farbstoff zu Eigenfluoreszenz in bestimmten Bereichen des Fisches. Lediglich eine teilweise stärkere Fluoreszenz im Dottersack konnte beobachtet werden, die auch im Experiment mit niedrigerer Konzentration bestätigt werden konnte. Dies stimmt auch mit dem makroskopischen Erstbefund überein, der dort die meiste eindiffundierte Substanz zeigte (**Abb. 32, B/C**).

Hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung auf den Zebrafärbfisch scheinen der Großteil der Farbstoffe ab einer teilweise schon sehr geringen Konzentration Effekte zu haben (**Tab. 16**). Diese zeigten sich überwiegend in Form einer ungewöhnlichen Rückgratentwicklung.

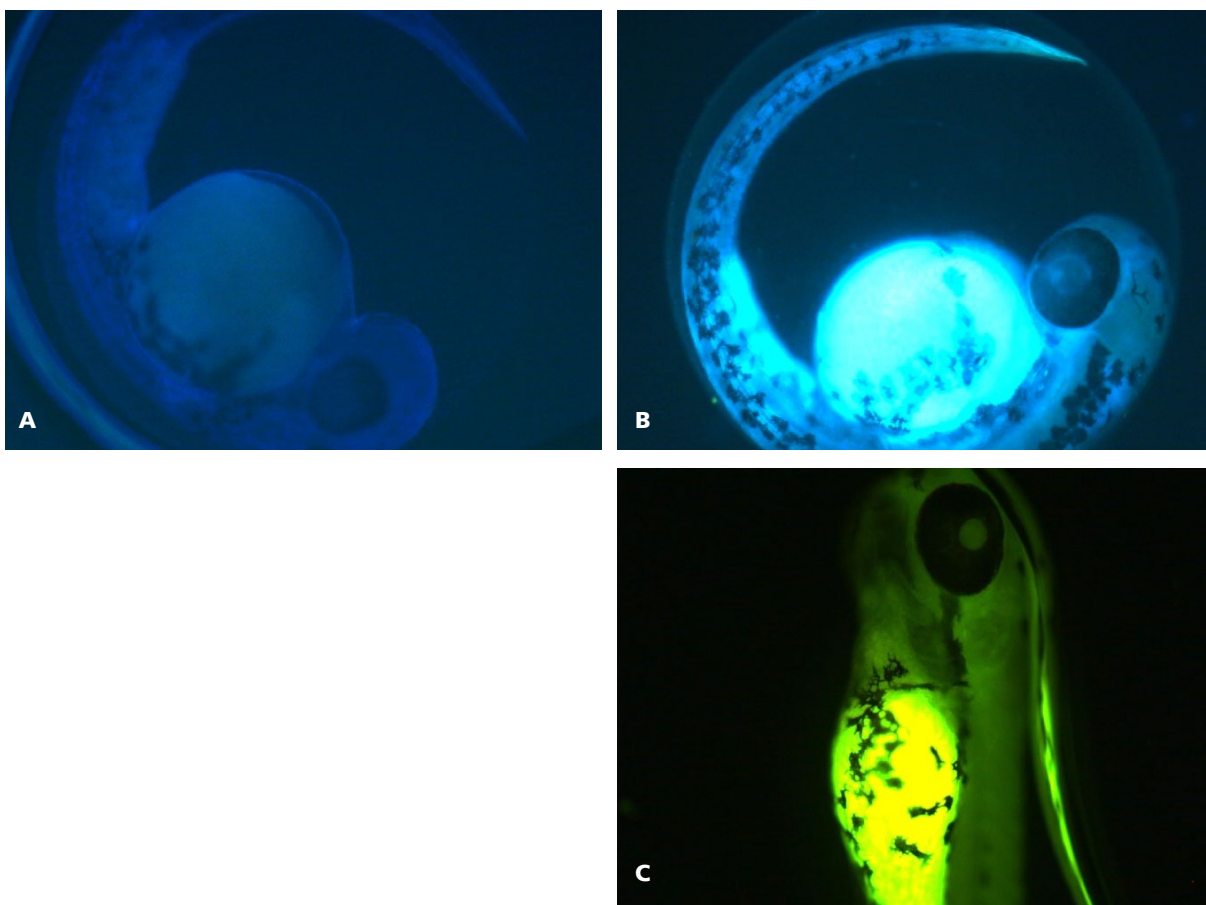


Abb. 32: **A:** Larve des Zebrafärblings der Kontrolle nach 48 hpf in der Autofluoreszenz; **B&C:** Larve des Zebrafärblings mit **BSc4090** (3 µM) nach 48 hpf (**B:** Filter ExG365(AF350)/FT 395/LP 420; **C:** Filter ExBP 450-490 (AF488)/FT 510/ LP 515) mit deutlich stärker fluoreszierendem Dottersack.

Im Falle von **BSc3824** kann sogar von einer letalen Wirkung der Substanz auf den Zebrafisch bei 10 µM ausgegangen werden. In Mausexperimenten mit Strukturanaloga dieser Substanzklasse wurde eine starke Gewichtsreduktion festgestellt, was damit das toxikologische Warnsignal für diese Substanzklasse bestätigt. Die Substanz **BSc4090** hatte hingegen in der Maus keine negativen Effekte; auch sind weitere stilben-analoge Farbstoffe in einem zellulären toxikologischen Assay ohne Auffälligkeiten getestet worden. Die wesentlich interessantere Frage, wo der Farbstoff nun in der Larve vorliegt, konnte leider mit den zur Verfügung stehenden filterbasierten Fluoreszenzmikroskopen nicht hinreichend analysiert werden. Das lag vor allem daran, dass die Zebrafärblinglarve in den vorhandenen Frequenzbändern leider eine ausgeprägte Autofluoreszenz aufweist. Eine Untersuchung dieses Phänomens mit den zur Verfügung stehenden Filtern zeigte bis in den Rotbereich endogene Autofluoreszenz in der Larve. Bereits ab einem frühen Stadium, circa 10 hpf, war eine intensive Autofluoreszenz zu beobachten (**Abb. 33 A-D**). Die im roten Bereich des Spektrums auftretende Autofluoreszenz war dabei relativ zu

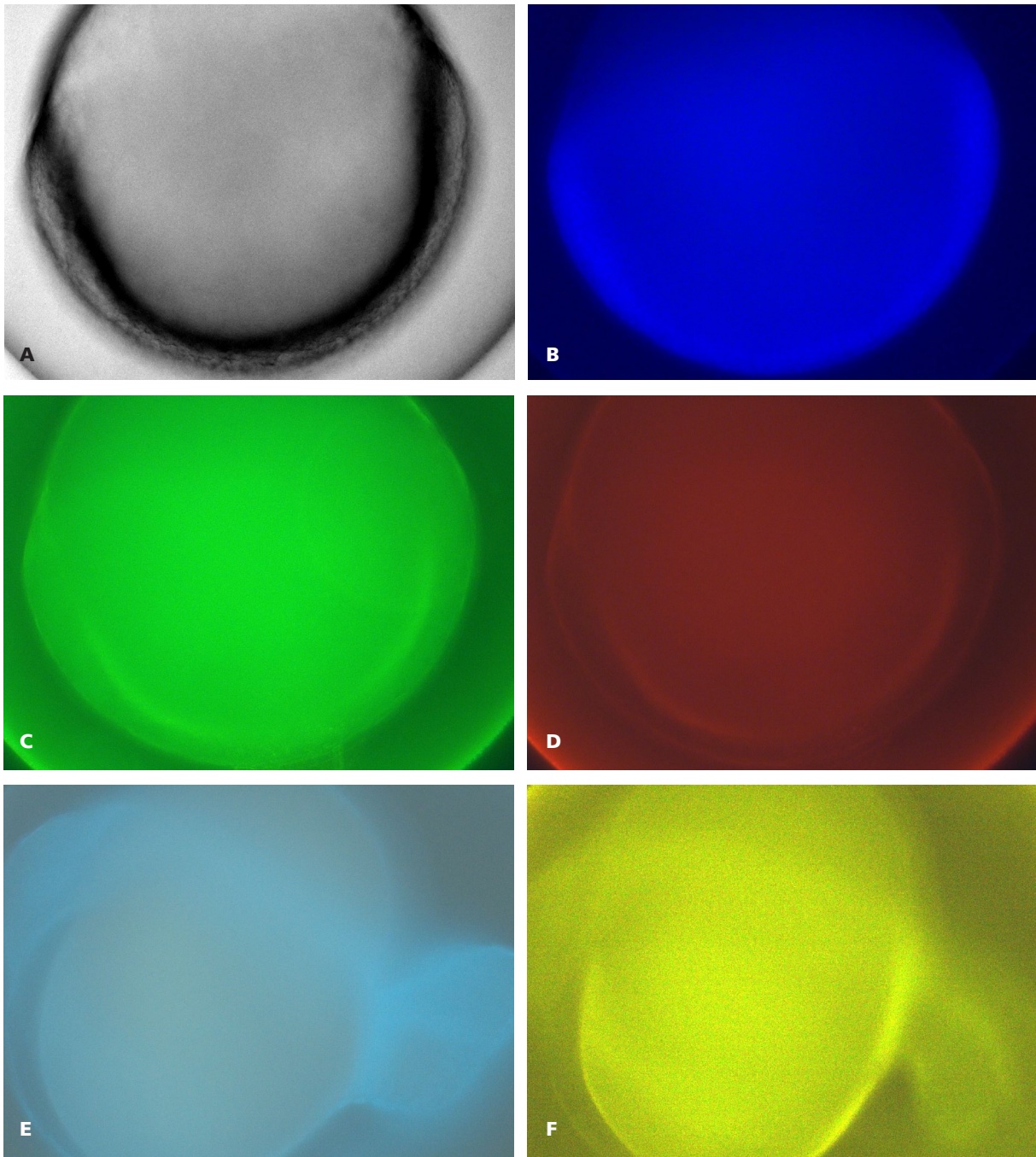


Abb. 33: Befruchtetes Zebrafärblingsei und dessen Autofluoreszenz (Objektiv 10x 0.45 Plan-Apochromat): **A:** Durchlicht ca 10 hpf, **B:** ca 10 hpf Filter ExG365(AF350)/FT 395/LP 420, **C:** ca 10 hpf Filter ExBP 450-490 (AF488)/FT 510/ LP 515, **D:** ca 10 hpf Filter Ex BP(AF) 546/ FT 580/LP 590, **E:** Larve ca 34 hpf Filter ExG365(AF350)/FT 395/LP 420, **F:** Larve ca 34 hpf Filter ExBP 450-490 (AF488)/FT 510/ LP 515 (unschärfe im Bild da ohne Betäubung aufgenommen)

den anderen Frequenzbereichen schwächer. Die Larve ist allerdings in den Bereichen der gängigen blau und grün Filter DAPI (Anregungsfrequenz (AF): 365 nm/Farbteiler FT 395/Emission LP 420) und FITC (AF: BP 450-490/Farbteiler (FT) 510/LP 515) immer stark autofluoreszierend (**Abb. 33, E-F**). Die nach mehr als 48 hpf bereits sehr weit entwickelte Larve zeigt keinerlei Abnahme oder Spezifizierung der Autofluoreszenzsignale (**Abb. 34**).

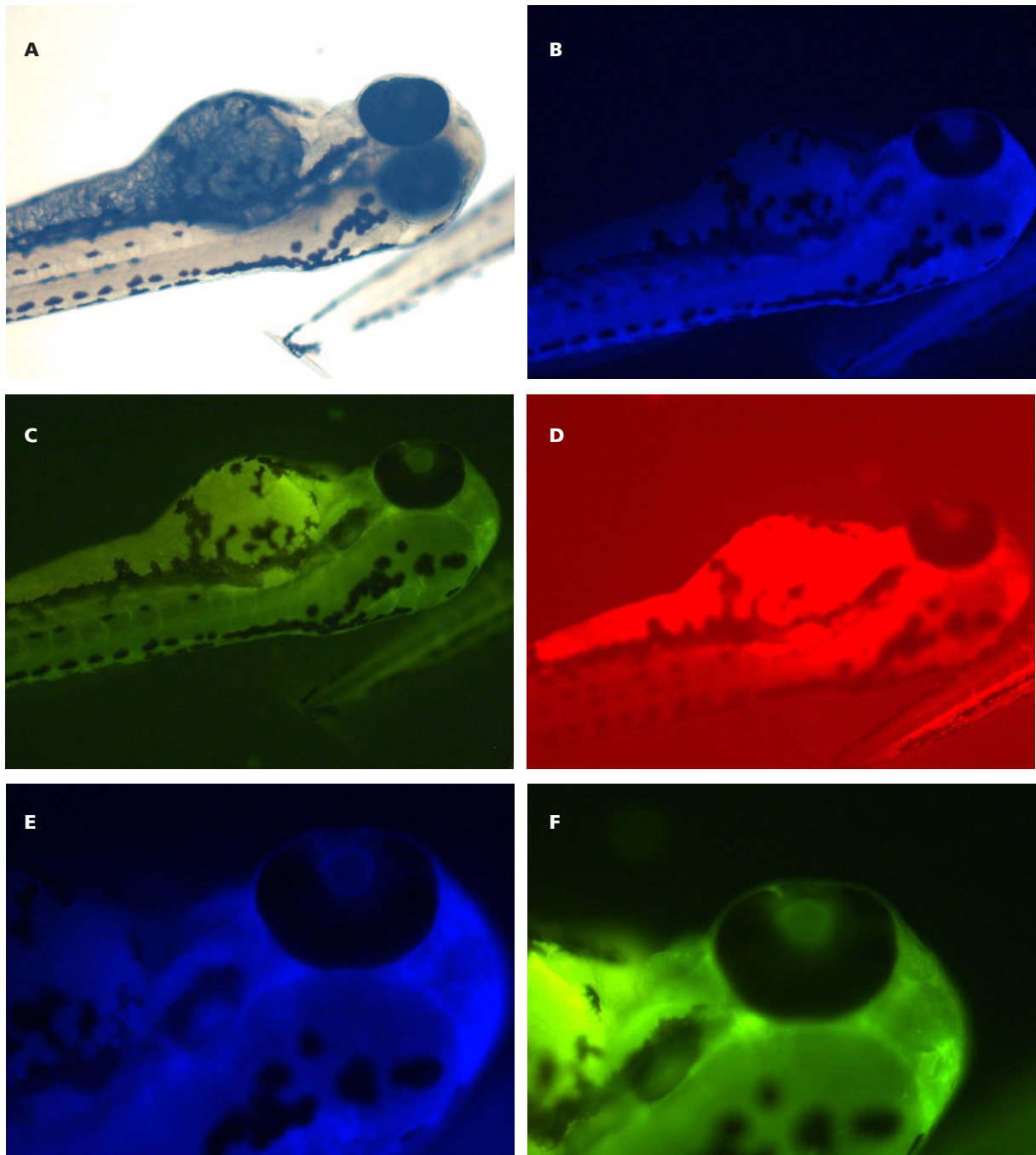


Abb. 34: Larve des Zebrafärblings 48 hpf in den verschiedenen Filterkanälen des Fluoreszenzmikroskops betrachtet: **A:** Durchlicht, **B:** DAPI-Filter, **C:** FITC-Filter, **D:** Auramin-Filter, **E & F:** DAPI-Filter, Detailaufnahme des Kopfes.

Lediglich die durchgeführten Experimente an Larven, denen das Chorion vorher entfernt wurde, zeigten eine schwächere Autofluoreszenzintensität im Vergleich zu den anderen beobachteten. Diese erlaubten allerdings auch keine differenzierteren Aussagen über die Verteilung in den Organen (**Abb. 32, A**). Es lässt sich im Wesentlichen nur sicher feststellen, dass die Farbstoffe in den Dottersack aufgenommen werden. Die weitere Verteilung und Aufnahme in die Organe, wie zum Beispiel das Auge, ist nicht hinreichend belastbar. Es konnte zwar bei einigen Larven etwas Auffälliges in Form granulärer Ansammlungen im Auge detektiert werden, aber keine valide Information erbracht werden, ob es sich dabei um den Farbstoff handelt (**Abb. 35, B**), da die Detailaufnahmen des Rumpfes und des Kopfes ebenfalls durch die Autofluoreszenz endogener Fluorophore dominiert werden (**Abb. 34/35**). Die fluoreszierenden Fragmente im Auge hatten zwar einen leicht anderen Farbeindruck und unterlagen einer starken Fotobleiche, sind aber ohne genauere spektrale Differenzierung nicht abzugrenzen (**Abb. 35**).

Die zur Verfügung stehenden Kamerasysteme und Mikroskope konnten dies nicht leisten. Leider konnten daher entsprechende weiterführende Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

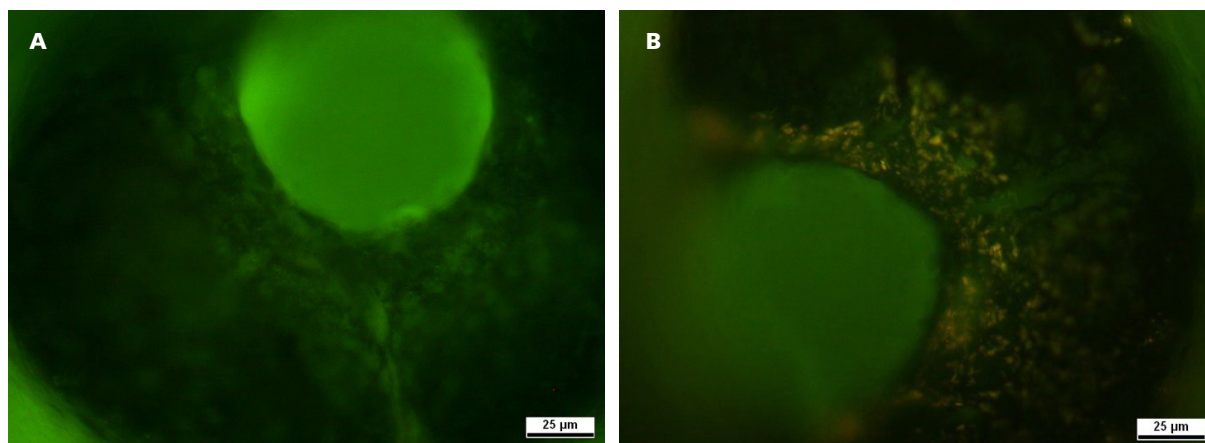
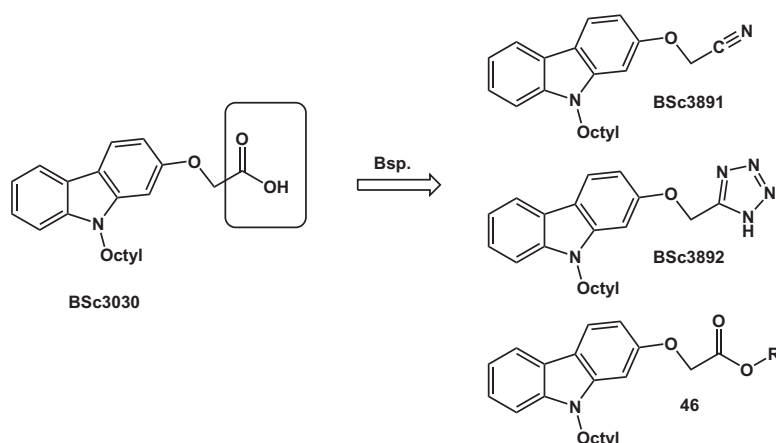


Abb. 35: Aufnahme des Auges einer Zebrafärbflinglarve 48 hpf mit 40 facher Vergrößerung: **A:** Autofluoreszenz ohne Farbstoff, **B:** Beobachtung mit 3 µM **BSc4090** (FITC-Filter).

3.8 Zusammenfassung

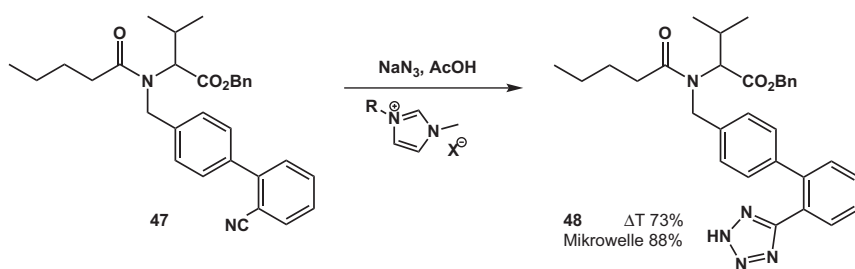
Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf den Teilgebieten Therapie und Diagnostik von Alzheimer-Demenz kurz zusammenfassend dargestellt.

Es wurden γ -Sekretase-Modulatoren auf der Basis des Carbazolgrundgerüsts synthetisiert. Die vorgenommenen chemischen Variationen der Säurefunktionalität gaben Hinweise auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Carbonsäurefunktionalität essentiell für die Aktivität ist. Dies konnte durch die schwächere Aktivität der Säureisostere im Vergleich zu den freien Säuren bezüglich der γ -Sekretasemodulation ermittelt werden (**Schema 08**) (Kapitel 3.2).



Schema 08: Beispiele der durchgeführten Variationen der Carbonsäure am aktiven γ -Sekretasemodulator BSc3030.

Die Synthese eines der Säureisostere (**BSc3892**) wurde unter anderem mit einer modifizierten Tetrazolsynthese in ionischen Flüssigkeiten durchgeführt. Diese im Vorfeld neu entwickelte Synthesemethode ist mit guten Ausbeuten und einer deutlichen Minimierung des Sicherheitsrisikos der Reaktion verbunden. Sie konnte dabei auch in der Synthese eines Intermediates des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan® (**47**) erfolgreich etabliert werden (**Schema 09**) (Kapitel 3.1).



Schema 09: Verbesserte Synthese des Valsartanintermediates in ionischen Flüssigkeiten in der Mikrowelle.

Es wurden Synthesen und Untersuchungen zur Evaluation verschiedener Farbstoffklassen durchgeführt, speziell im Hinblick auf ihre Verwendung als Marker für pathologische Merkmale der Alzheimer-Demenz. Dabei gelang die Synthese von neuen selektiven und aktiven fluoreszierenden Farbstoffen (Kapitel 3.3-3.6) (**Abb. 36**).

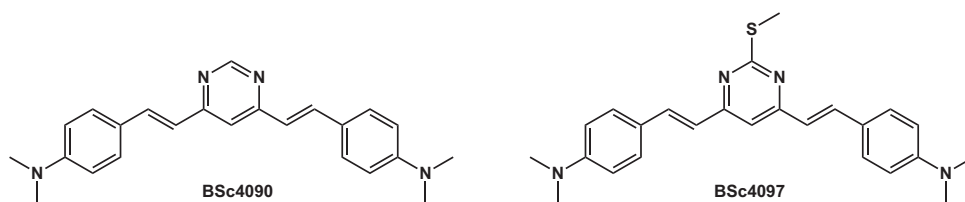
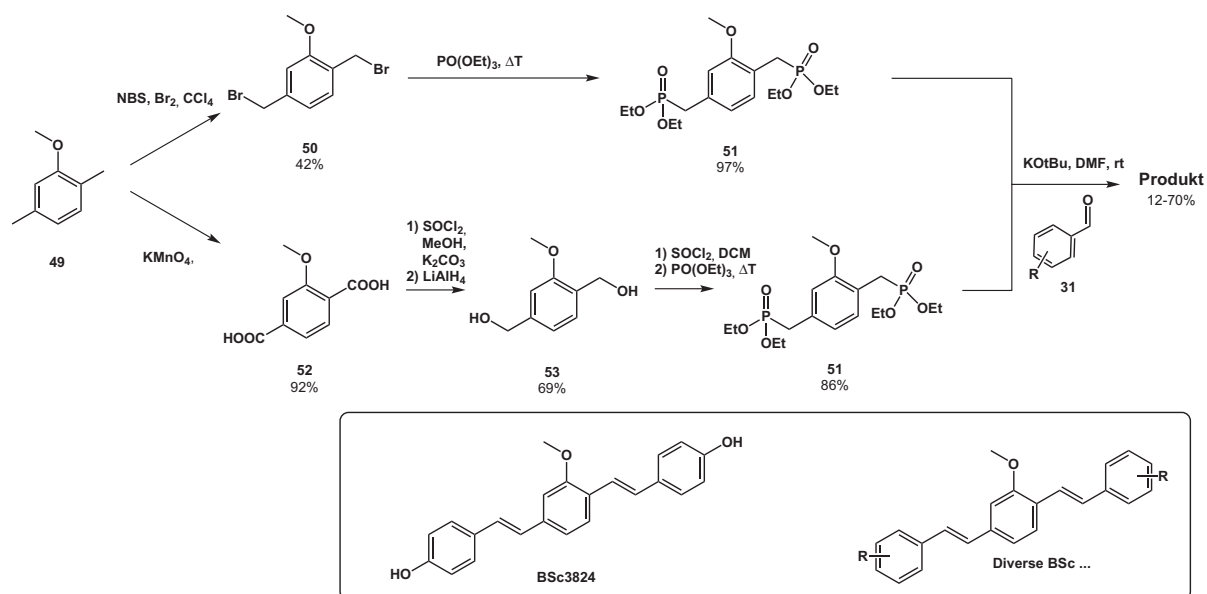


Abb. 36: Die zurzeit aktivsten Marker aus der Substanzklasse der Divinyldiazine (**BSc4090** & **4097**).

Auch konnte die Synthese des etablierten Methoxy-XO4 (**Bsc3924**) in einer vereinfachten Route vorgenommen, sowie weitere aktive Derivate dieser Verbindungsklasse hergestellt werden (**Schema 10**). Die sehr guten optischen Eigenschaften der auf diese Weise dargestellten Probe bewährte sich in zahlreichen Tierexperimenten. Dabei konnten auch neue Erkenntnisse speziell im Hinblick auf das Plaquewachstum in Tg2576 Mäusen gewonnen werden. Das dabei festgestellte Wachstumsverhalten deutet darauf hin, dass eine erfolgreiche Therapie zu Beginn der Plaquebildung am effektivsten wäre, da die Wachstumsrate sich umgekehrt proportional zum Plaquevolumen verhält (Kapitel 3.3). Methodisch konnten ebenfalls Entwicklungen unterstützt werden, die es ermöglichen ein wiederholtes Langzeit *in vivo* Imaging vorzunehmen. Diese beinhalten eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit, kürzere Messzeiten und weniger Ausschuss bei höherem Durchsatz (Kapitel 3.4).



Schema 10: Die Synthese von **BSc3924**.

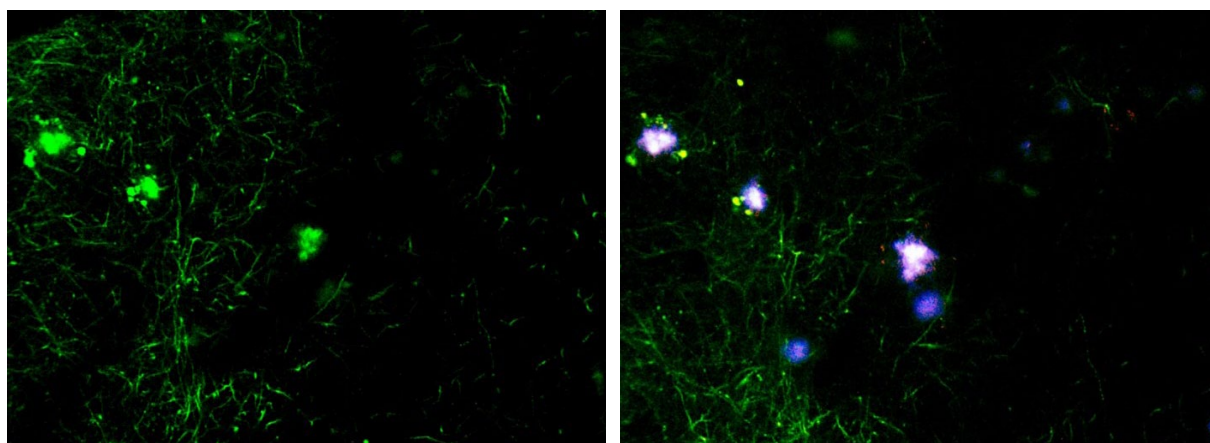


Abb. 37: A: BSc4090 in der PS1APPswe Maus (2 mg/kg intraperitoneal (ip.) einfache Dosis nach 4h). Es sind die amyloiden Plaques *in vivo* durch ein kraniales Fenster zu sehen. **B: BSc4090** in Co-Lokalisation mit Methoxy-XO4 (**BSc3924**) in der PS1APPswe Maus (2 mg/kg ip. einfache Dosis nach 2 Tagen). [Ex: 880 nm; Em: 500-550 nm]

Des Weiteren wurde aus der mit ihren sehr guten Aktivitäten für die Anwendung in AD-Diagnostik geeigneten Klasse der Divinylpyridazine zahlreiche Substanzen synthetisiert. Dabei zeigt die Struktur **BSc4090** im Mausmodell bereits *in vivo* Potential, was die Hirngängigkeit und die spezifische Markierung der pathogenen Ablagerungen belegte (**Abb. 37**). Die daraus resultierenden Patentanmeldungen für fluoreszenzdiagnostische Verfahren an der Retina und in der Nase basieren weiterhin auch auf den nachfolgend zusammengefassten Ergebnissen aus histologischen Untersuchungen (Kapitel 3.5). Dafür wurden für die Evaluation potentieller Substanzen für die Fluoreszenzmarkierung eine histologische Untersuchungsroutine und ein Zebrafisch-basiertes Testsystem aufgebaut.

Die aufgebaute Zebrafisch-Zuchtanlage konnte Laich für Untersuchungen und Testung der hergestellten Substanzen liefern. Die Experimente hinsichtlich verschiedener Bioparameter, wie zum Beispiel Toxizität und Biodistribution waren dabei im Fokus. Sie konnten die auch in zellulären Assays gefundene Unbedenklichkeit der **BSc4090** und weiteren abgeleiteten Derivaten bestätigen.

Eine histologische Färberroutine wurde für die schnelle Tauglichkeitsuntersuchung der Markersubstanzen im Hinblick auf Fluoreszenzmarkierung von pathologischen Ablagerungen der AD an menschlichem Hirngewebe und anderen Gewebearten etabliert. Die Untersuchung einer Vielzahl von Farbstoffen führte zu der Identifizierung der bereits erwähnten aktiven Verbindungen und dem Ausschluss anderer Leitstrukturen (Kapitel 3.6). Wichtige Ergebnisse konnten auch aus weiteren histologischen Untersuchungen an eventuell für die Diagnostik der Alzheimer-Demenz nutzbaren Geweben gewonnen werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass in der Nase von AD-Patienten, speziell im Riechepithel, relevante Ablagerungen zu finden sind. Die Färbung anderer Targets, wie zum Beispiel α -Synuclein im Falle von Morbus Parkinson war hingegen nicht erfolgreich. Auch die Untersuchung von Darmgewebe lieferte keine endgültigen Resultate.

Der Weg für eine konkrete Anwendung von Fluoreszenzdiagnostik an der Retina oder in der Nase ist somit im Rahmen dieser Arbeit in einigen Teilen vorbereitet und mitentwickelt worden.

3.9 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Möglichkeiten und Aufgaben. Die hergestellten fluoreszierenden Farbstoffe könnten nicht nur im Bereich der Diagnostik eine Verwendung finden. Sie wären auch für andere Anwendungen denkbar, wie zum Beispiel im Bereich von Farbstofflasern, als Zwei-Photonen Fluoreszenzfarbstoffe, in der super hochauflösten Mikroskopie jenseits der Abbeschen Auflösungsgrenze oder für Anwendungen in der Photovoltaik und in organischen Halbleitern.^[64, 124a-d]

Die Entwicklung einer als Fluoreszenzmarker einsetzbaren Sonde für eine Diagnostik an der Retina erfordert noch weitere Anpassungen. Dazu gehört die Auslegung der Sonde an die speziellen Geräteparameter. Im Falle des bereits in der Entwicklung befindlichen ophthalmologischen Scanners wurden diese in den letzten Wochen vor Beendigung dieser Arbeit im Rahmen des BMBF MINDe-Verbundes (*Molecular Diagnosis of Neurodegenerative Diseases in the Eye*) vorgegeben. Der Scanner muss bei 450 nm eine optische Fixierung vornehmen, was die Anregung erst bei einer Wellenlänge darüber optimal ab 488 nm ermöglicht. Die Emission kann dann zwischen 488 und 750 nm bis im Sonderfall maximal 850 nm erfolgen. Diese relativ frühe obere Grenze im nahinfraroten Bereich ist für das *Tracking* und *Alignment* des Scanners erforderlich (**Abb. 38**). Die derzeit für ophthalmologische Untersuchungen bereits zugelassenen Fluorophore, Fluorescein und Indocyangrün mit ihren spektralen Eigenschaften sind für eine relative

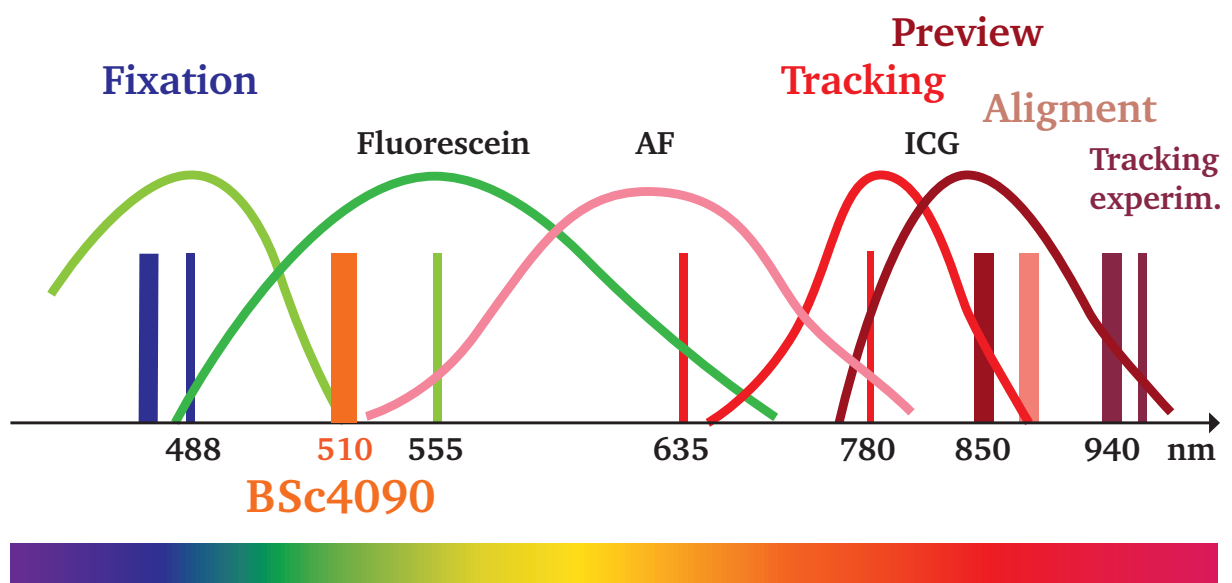


Abb. 38: Die spektralen Vorgaben eines in der Entwicklung befindlichen ophthalmologischen Scanners.

Einordnung bereits in der Ophthalmologie gängiger Arbeitsbereiche vermerkt (**Abb. 39**). Die in diesem Spektraldiagramm (**Abb. 38**) eingezeichnete im Auge zu erwartende Autofluoreszenzbande (AF) ergibt für die Entwicklung nachfolgende Problematik. Dadurch, dass sie einen relativ breiten Bereich von 555 nm bis 780 nm aufweist, muss eine zukünftige Optimierung einer Probe nach folgenden Vorgaben erfolgen: Damit es zu keiner Konkurrenz zwischen dem Fluorophor und der Eigenfluoreszenz von in Proteinen enthaltenen Flavinen kommt, sollte eine Emission auf dem Target zwischen 500 bis 550 nm oder zwischen 720 bis 850 nm erfolgen. Andererseits kann dieses Problem bei einer entsprechend affinen, selektiven und bioverfügbaren Probe auch durch eine entsprechende spektrale Separierung gelöst werden. Die Mindestanforderung sind dabei lediglich 10-20 nm Differenz zwischen den Maxima der Emissionen, ob eine Entmischung dann aber gelingt muss für den jeweiligen Einzelfall untersucht werden.

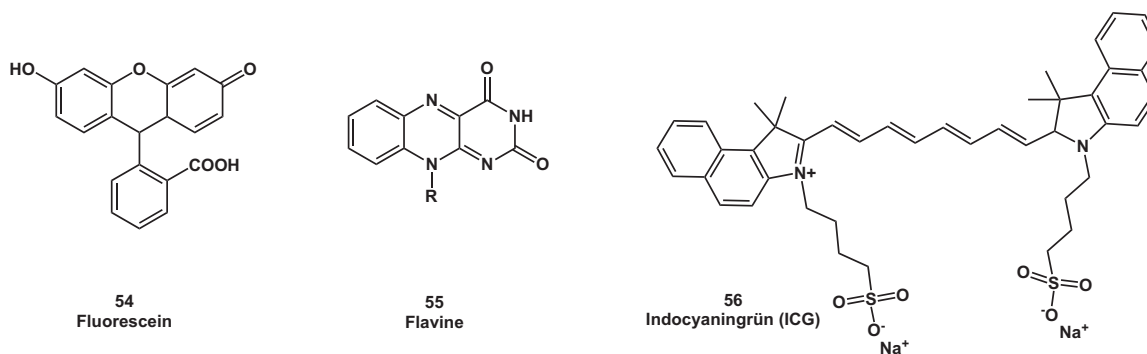
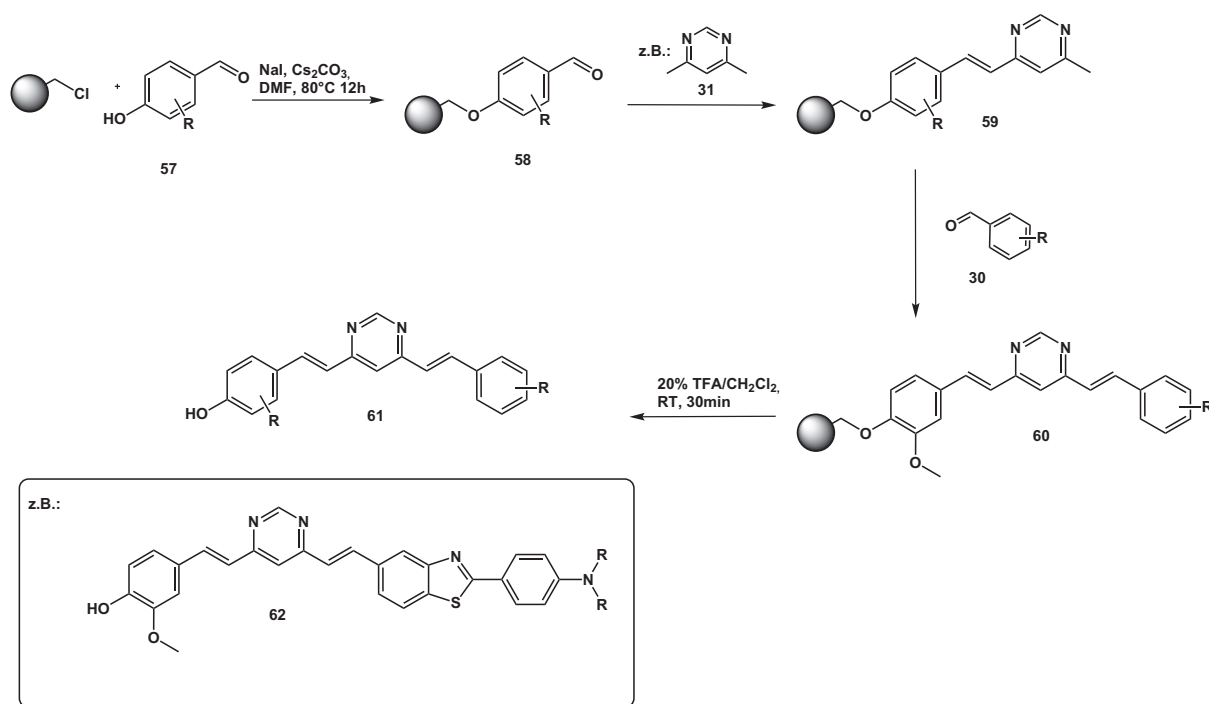


Abb. 39: Darstellung der beiden zugelassenen ophthalmologischen Farbstoffe Fluorescein und ICG sowie die Flavine die den größten Anteil an der Autofluoreszenz haben.

Für eine Optimierung in dieser Hinsicht sollte auch die Emission auf dem Target intensiver untersucht werden, da sie sich von den in Lösung gemessenen Spektren deutlich unterscheiden kann. Diese konsequent zu messen ist allerdings bei der derzeit üblichen Verwendung von entsprechend ausgerüsteten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sehr aufwendigen und kostenintensiv. Eine deutlich preiswertere und schnellere Variante würde eine entsprechende spektral auflösende Kamera bieten. Ein solches System könnte auch die Problematiken mit der Eigenfluoreszenz im Zebrabärbling lösen. Generell könnten detailliertere Fluoreszenzdaten die *on Target* gewonnen werden mit Hilfe von daraus erstellten Computersimulationen eventuell genauere Informationen über die Bindungsumgebung liefern. Dies könnte dann sowohl für eine Verbesserung der Probe als auch im Sinne einer Struktur-Aktivitäts-Vorhersage genutzt werden.

Im dem Bereich der histologischen Untersuchungen sind ebenfalls noch weitere Arbeiten angedacht. Es wird unter anderem an einer statistischen Auswertung von ungefähr 100 Nasenpräparationen gearbeitet. Dabei können dann auch durch Extraktion die genauen Menge an Tau-Protein und welche Tau-Isoformen vorliegen, bestimmt werden. Die Untersuchung von weiteren Geweben mit anderen Taupathien ist dabei ebenfalls von Interesse.

Für die zukünftige Synthese sind strukturell sicherlich noch eine Vielzahl an bisher unentdeckten Leitstrukturen denkbar. Speziell aus dieser Arbeit könnte dabei über einen Festphasensynthetischen Ansatz für asymmetrische Derivate von sowohl der Benzoiden Bisstilben als auch der Divinylpyridazin Farbstoffe, wie sie nachfolgend vorgeschlagen ist nachgedacht werden (**Schema 11**).



Schema 11: Syntheseentwurf für die Darstellung asymmetrischer Divinylpyridazinderivate.

4. Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics, Fisher Scientific, ABCR und VWR gekauft und direkt eingesetzt. Die absoluten Lösungsmittel DMF und THF wurden von Acros Organics in mit Septum versiegelten Flaschen gekauft und direkt eingesetzt, wasserfreies Methanol und Ethanol wurden durch Destillation über Magnesium erhalten und über 3 Å Molsieb gelagert. Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren an einem Mettler FP-51 Halbautomat bestimmt.

Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern ARX 300 und DRX 500 der Firma Bruker Biospin GmbH aufgenommen. Die jeweilige Messfrequenz und das verwendete Lösungsmittel sind den spektroskopischen Daten in Klammern vorangestellt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm tieffeldverschoben zu Tetramethylsilan als interner Standard ($\delta = 0$ ppm) angegeben. ESI-MS-Spektren wurden mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer und EI-MS-Spektren mit einem doppelt fokussierenden Massenspektrometer MAT 95 aufgenommen. Die detektierten Ionenmassen m/z werden in u angegeben. Die IR-Spektren wurden an einem Perkin Elmer FT-IR Spektrometer Paragon 1000 PC aufgenommen. Die UV/Vis-Spektren wurden an einem Shimadzu UV 2401PC *UV-vis Recording Spektrometer* mit einer Spaltbreite von 2 nm gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden an einem Shimadzu RF 1501 *Spektrofluorophotometer* mit einer Spaltbreite von 2 nm gemessen. Die 2D-Fluoreszenzspektren wurden an einem Tecan Infinite® M1000 mit einer Spaltbreite von 5 nm gemessen.

Die histologischen Färbungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 der Firma Zeiss (HBO 100 Lampe, Seriennummer: 48692) und mit DAPI (Anregungsfrequenz (AF): G 365/Farbteiler FT 395/Emission LP 420), FITC (AF: BP 450-490/Farbteiler (FT) 510/LP 515), Auramin (AF: BP 546/FT 580/LP 590), AQUA™ Breitbandfiltern untersucht. Die Bilder wurden mit einer Leica FDC 300FX Kamera aufgenommen. Die Zebrafischbilder wurden auf einer Leica ESL Binocularlupe (Serien-Nr.: 10447205485356) mit aufgesetzter Kamera (Panasonic DMC-TZ10, Serien-Nr.: FNODB007358) sowie auf einem Zeiss Axio Scope A1 Fluoreszenzmikroskop, Kamera AxioCam MRc Zeiss (Objektive 10x 0.45, 20x 0.8, 40x 0.13-0.21 Plan-Apochromat) mit folgenden Filtern ExG365(AF350)/FT 395/LP 420; ExBP 450-490 (AF488)/FT 510/LP 515; Ex BP(AF) 546/FT 580/LP 590; ExBP 640-650(AF 647)/FT 660/BP 690 ausgerüstet, erstellt.

HPLC-Messungen erfolgten an einem Agilent 1100 (Säule: *reversed phase*, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm, Wellenlängendetektion bei 254 nm). Es wurde ein MeCN/Wasser Laufmittel-Gradient verwendet (Standardmethode: 70% H₂O; 30% MeCN (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (Laufzeit 12 min); schnelle Methode (M_{schnell}) 70% H₂O; 30% MeCN (0 bis 1 min) auf 90% MeCN (Laufzeit 8 min), Flussrate jeweils 1 mL/min). Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 mit Korngrößen zwischen 0.04-0.06 µm der Firma Merck verwendet. Zur Dünnschichtchromatographie dienten DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F254 der Firma Merck. Die entwickelten DC-Chromatogramme wurden unter UV-Licht (254 und 366 nm) ausgewertet. Zum Einfärben der Platten wurde bei Bedarf Ninhydrin-, Vanillin- oder Kaliumpermanganat Lösung sowie Iod verwendet.

Die jeweiligen Färbelösungen wurden in folgenden Zusammensetzungen hergestellt:

- 1) Ninhydrin (1 g) in Ethanol (180 mL) und Essigsäure (10 mL),
- 2) Vanillin (1 g) in Methanol (170 mL), Essigsäure (20 mL) und konz. H₂SO₄ (10 mL).
- 3) Kaliumpermanganat 1 gew.% in H₂O
- 4) Iod Elementar

Als Ultraschallbad wurde ein Elma® Transsonic 460 verwendet. Zentrifugiert wurde mit einer Martin Christ UJ-0 100W Zentrifuge. Microvial sind dickwandige 1.5 mL oder 2 mL Spitzbodengefäße der Firma Wheaton, die mit Schraubkappen und teflonbeschichteten Gummisepten verschlossen werden. Sie wurden in einem temperierbaren Aluminium-Karussell mit 12 Bohrungen eingesetzt. Radley Reaktionsgefäßen sind 20 mL Glasgefäße der Firma Radley die in einem 12 Positionen fassendem Caroussel™ temperiert werden können. Die verwendete Mikrowelle ist eine Biotage Initiator™ 300 W mit Reaktionsgefäßen folgender Größen 0.2-0.5 mL, 2.0-5.0 mL und 10-20 mL. Elementaranalysen wurden mit Hilfe eines Vario EL III der Firma Elementar durchgeführt.

4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

4.2.1 AAV für die Darstellung der Methoxy-Bisstilbene

In einem am Hochvakuum getrockneten Wheaton Vial (2.5mL) wird unter Argon zu einer Suspension von Kalium-tert-butanolat (215 mg; 0.48 mmol) in DMF (1 mL) das Tertaethyl (2-methoxy-1,4-phenyl)bis(methylen)diphosphonat (**50**) (100 mg, 0.24 mmol) in DMF (0.5 mL) zugegeben. Es wird für 30 min bei RT gerührt. Dann wird Aldehyd (0.42 mmol) in DMF (0.5 mL) tropfenweise zugegeben. Es ist beim Zutropfen meist eine Farbänderung der dunkelroten Suspension zu beobachten. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit 1N HCl_{aq} (20 mL) versetzt und mit EtOAc (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1N HCl_{aq} (2x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das Produkt wird durch Umkristallisation oder Säulenchromatographie aufgereinigt.

4.2.2 AAV für die Darstellung der Bisstilbenpyrimidine

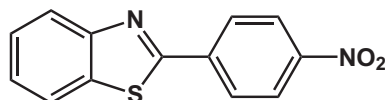
In einem 20 mL Radley Reaktionsgefäß wird 4,6-Dimethylpyrimidin (100 mg, 0.92 mmol), Aldehyd (1.8 mmol) und Aliquat 336 (13 mg, 0.09 mmol) in einer 5 M NaOH-Lösung (10-15 mL) gelöst. Die Lösung wird für 1-3 h bei 111 °C zum Sieden erhitzt, anschließend für 3-12 h bei RT gerührt. Aus der Reaktionslösung scheidet sich das Rohprodukt als Feststoff oder Öl ab. Der Feststoff wird abfiltriert und säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation gereinigt. Die erhaltenen Öle werden mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

4.2.2.1 AAV für die Darstellung der Bisstilbenpyrimidine (wasserfreie Variante)

4,6-Dimethylpyrimidin (**31**) (100 mg, 0.92 mmol), Aldehyd (1.8 mmol) und KOtBu (201 mg, 1.8 mmol) werden in DMF (10 mL) suspendiert und für 2 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wird das ausgefallene Rohprodukt abfiltriert und säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation gereinigt. Fällt kein Rohprodukt aus, wird die Reaktionslösung mit Wasser (50 mL) versetzt und mit EtOAc oder Chloroform (je 3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lsg. (3x 60 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation gereinigt.

4.3 Synthesen der hergestellten Verbindungen

2-(4-Nitrophenyl)benzothiazol (**42**)



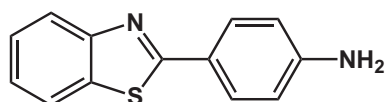
Zu einer gelben Lösung von 2-Aminothiophenol (**40**) (5.00 g, 26.9 mmol) in trockenem *N*-Methyl-2-pyrrolidon (20 mL) wird unter Rühren über 15 min 4-Nitrobenzoylchlorid (**41**) (3.48 mL, 26.9 mmol) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 1 h bei 100°C zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die Reaktionslösung in Eiswasser gegeben und mit konz. NH_3 (aq) auf pH = 9 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit MeOH gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Es werden 6.63 g (96%) 2-(4-Nitrophenyl)benzothiazol (**42**) als gelber Feststoff erhalten.

HPLC t_R = 8.15 min (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.31(dd, J = 26.0, 9.1 Hz, 4H), 8.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz ; 1H), 7.58-7.43 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 164.8, 154.1, 149.0, 139.2, 135.5, 128.2, 126.9, 126.2, 124.3, 123.9, 121.8 ppm.

4-(Benzothiazol-2-yl)benzenamin (**43**)



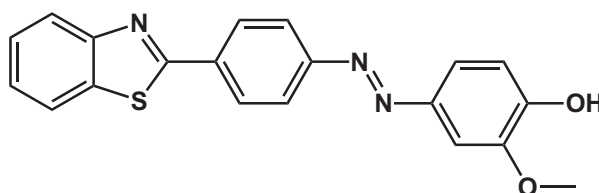
Zu einer Lösung von 2-(4-Nitrophenyl)benzothiazol (**42**) (6.62 g, 25.9 mmol) in EtOH (200 mL) wird sukzessive Zinnchlorid-Dihydrat (32.5g, 129 mmol) zugegeben und 1h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die Reaktionlösung auf Eiswasser gegeben, mit 10% NaOH-Lösung auf pH = 9 eingestellt und mit EtOAc (3x 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (3x 80 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es werden 5.71 g (97%) 4-(Benzothiazol-2-yl)benzenamin (**43**) als gelber Feststoff erhalten.

HPLC t_R = 4.83 min (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.00 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.92-7.88 (m, 2H), 7.86-7.83 (m, 1H), 7.47-7.41 (m, 1H), 7.34-7.29 (m, 1H), 6.75-6.70 (m, 2H), 3.84 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 168.5, 154.3, 149.3, 134.5, 129.2, 126.1, 124.5, 123.9, 122.5, 121.4, 114.8 ppm.

4-((4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)-2-methoxyphenol (BSc3814)



Zu einer Lösung aus H_2O (25 mL), konz. H_2SO_4 (4 mL), Eis (50 g) und 4-(Benzothiazol-2-yl)benzenamin (**42**) (5.71 g, 25.2 mmol) wird eine Natriumnitritlösung (1.74 g, 25.2 mmol in H_2O (10 mL)) bei 0°-5°C zugetropft. Die Lösung wird auf pH < 5 eingestellt, eventuell überschüssiges Nitrit wird durch Zugabe von Harnstoff entfernt. Für die Azokupplung wird 2-Methoxyphenol (2.77 mL, 25.2 mmol) in 1 M NaOH-Lösung (20 mL) gelöst und die Diazonium-Lösung unter kräftigem Rühren zugetropft. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und aus EtOH umkristallisiert. Es werden 4.78 g (52%) **BSc3814** als rotbrauner Feststoff erhalten.

HPLC (M_{schnell}) t_R = 6.02 min (90 %).

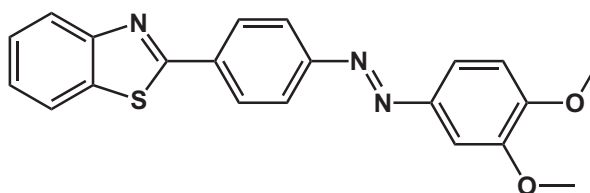
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.23 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.53-7.49 (m, 2H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.08 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 167.5, 154.6, 154.4, 149.8, 147.6, 147.2, 135.6, 135.3, 128.8, 126.9, 125.8, 123.8, 123.6, 122.5, 122.0, 114.7, 102.2, 56.5 ppm.

MS (EI) m/z = 361 $[\text{M}]^+$, 210, 151, 123.

Abs/ Em_{max} = 375/450 nm.

2-((4-((3,4-Dimethoxyphenyl)diazenyl)phenyl)benzothiazol (BSc4046)



4-((4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)-2-methoxyphenol (**Bsc3814**) (20 mg, 0.05 mmol) wird in MeOH (500 μ L) unter Argon gelöst. Anschließend wird Natriumhydrid (2.9 mg, 0.12 mmol) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Nach zu tropfen von Methyljodid (7 μ L, 0.11 mmol) wird für weitere 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegeben mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung (3x 20 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird **BSc 4046** 20 mg (96%) als roter Feststoff erhalten.

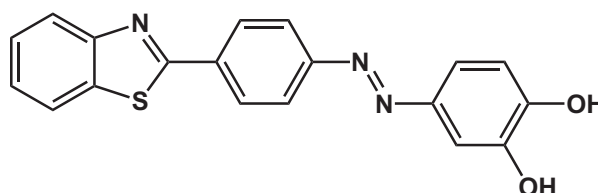
HPLC (M_{schnell}) t_R = 9.40 min (90 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.24 (m, 2H), 8.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.05-7.97 (m, 2H), 7.96-7.87 (m, 1H), 7.68 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.43-7.38 (m, 1H), 7.02 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.99 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 166.1, 153.2, 151.4, 148.7, 146.1, 134.2, 133.9, 127.4, 125.5, 124.5, 122.4, 122.2, 120.8, 120.7, 109.4, 100.7, 55.1, 54.6 ppm.

MS (EI) m/z = 375 $[\text{M}]^+$, 210, 137.

4-((4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)benzo-1,2-diol (BSc4207)



4-((4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)-2-methoxyphenol **BSc3814** (50 mg, 0.13 mmol) wird in DCM (3 mL) gelöst. Unter Argon wird Bromtribromid (65 μ L, 0.69 mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegeben mit EtOAc (3x 25 mL) extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung (3x 30 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/2)

BSc 4207 (33 mg; 75%) erhalten

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.50.

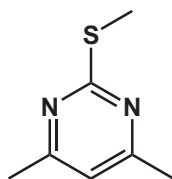
HPLC (M_{schnell}) t_R = 7.56 min (86 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 9.94 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.59-7.56 (m, 1H), 7.51-7.48 (m, 1H), 7.43 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 181.8, 152.8, 152.7, 149.7, 145.4, 144.9, 133.8, 133.2, 127.5, 126.0, 124.2, 122.2, 122.1, 119.5, 114.6, 105.3 ppm.

MS (ESI) m/z = 348.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 226.9, 211.0.

4,6-Dimethyl-2-(methylsulfanyl)pyrimidin (32)



Zu einer Lösung aus 4,6-Dimethylpyrimidine-2-thiol (**35**) (3.00 g, 21.4 mmol) in Acetonitril (40 mL) wird unter Rühren Natriumethanolat (1.60 g, 23.5 mmol) zugegeben. Die reaktionslösung wird für 15 min bei RT gerührt, tropfenweise mit Methyljodid (6.07 g, 42.8 mmol) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird über Kieselgel (EtOAc/Cy (1:5)) filtriert. Es wird 3.0 g (93 %) Produkt als hellgelbes Öl erhalten, dass langsam zu einem gelben Feststoff auskristallisiert.

R_f (EtOAc/Cy 1:4) = 0.52.

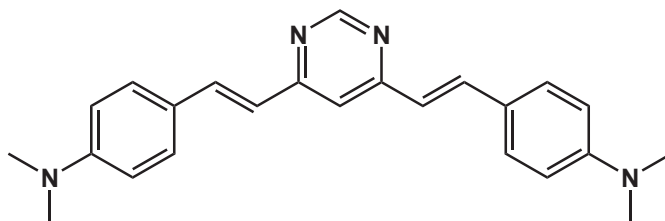
HPLC t_R = 2.97 min (98 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 6.70 (s, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.35 (s, 6H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.3, 166.9, 115.5, 23.7, 14.0 ppm

SMP = 23 °C.

4-((1E)-2-(6-(4-(Dimethylamino)styryl)pyrimidin-4-yl)vinyl)-N,N-dimethylbenzylamin (BSc4090)



Nach AAV 3.2.2 wird mit 4-(Dimethylamino)-benzaldehyd (**36**) (275 mg, 1.85 mmol) umgesetzt. Es wird 65 mg (20%) **BSc4090** nach Umkristallisation (MeOH) als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.28.

HPLC t_R = 6.52 min (100 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.90 (s, 1H), 7.73 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.06 (s, 1H), 6.76 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 2.93 (s, 12H) ppm.

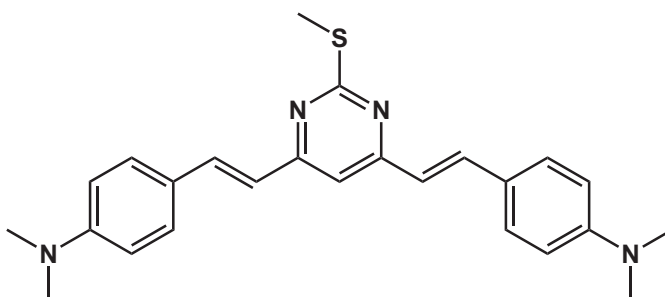
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 163.4, 158.5, 151.5, 137.6, 129.5, 124.2, 121.2, 115.4, 112.4, 40.6 ppm.

MS (EI) m/z = 370 $[\text{M}]^+$, 326, 283.

SMP = 193°C.

Abs/ Em_{max} = 400-460/560 nm.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-(Methylthio)pyrimidine-4,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (BSc4097)



Nach AAV 3.2.2 wird 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (**36**) (194 mg, 1.29 mmol) umgesetzt. Es wird 175 mg (65%) gelber Feststoff von **BSc4097** nach Umkristallisation (MeOH) erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.83.

HPLC t_R = 7.27 min (97 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.80 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.70 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 3.01 (s, 12H), 2.67 (s, 3H) ppm.

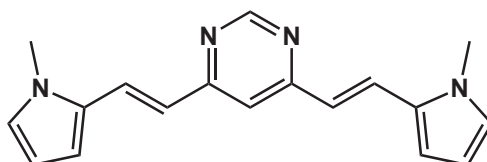
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.2, 163.1, 151.0, 137.1, 129.1, 124.0, 121.1, 112.1, 110.7, 40.2, 14.2 ppm.

MS (EI) m/z = 416 $[\text{M}]^+$, 401, 369, 326.

SMP = 225°C.

Abs/ Em_{max} = 443/551 nm.

4,6-Bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrimidin (BSc4327)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethylpyrimidin (**31**) (150 mg, 1.38 mmol) mit 1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (302 mg, 2.77 mmol) und Aliquat 336 (55 mg, 0.13 mmol) umgesetzt. Es wird 162 mg (40%) **BSc4327** nach Säulenchromatographie (Axel Semrau FlashMaster Cy/EE Gradient) als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.83.

HPLC t_R = 5.32 min (83%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.98 (s, 1H), 7.86 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.78-6.69 (m, 6H), 6.21-6.19 (m, 2H), 3.77 (s, 6H) ppm.

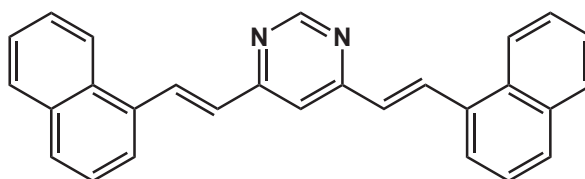
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 162.7, 158.5, 130.8, 125.9, 124.4, 121.4, 116.1, 110.0, 109.1, 108.3, 34.3 ppm.

MS (EI) m/z = 289.2 $[\text{M}-1]^+$, 275.2.

SMP = 175°C.

Abs/ Em_{max} = 358-458/528 nm.

4,6-Bis((*E*)-2-(naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin (BSc4328)



Nach AAV 3.2.2 wird 1-Naphthaldehyd (287 mg, 1.84 mmol) und Aliquat 336 (37 mg, 0.09 mmol) umgesetzt. Es wird 110 mg (40%) **BSc4328** nach Säulenchromatographie (Axel Semrau FlashMaster Cy/EE Gradient) als grüngelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.66.

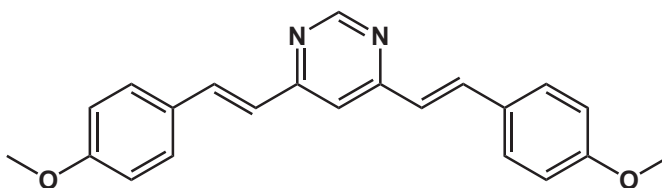
HPLC t_R = 9.92 min (92%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.12 (s, 1H), 8.69 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.80-7.75 (m, 6H), 7.50-7.40 (m, 6H), 7.24 (s, 1H), 7.06 (d, J = 15.6 Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 162.8, 158.8, 134.1, 133.7, 133.2, 131.5, 129.7, 128.5, 126.6, 126.1, 125.5, 124.5, 13.7, 116.9 ppm.

MS (EI) m/z = 383 $[\text{M}-1]^+$, 275.2.

4,6-Bis(methoxystyryl)pyrimidin (BSc4519)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4-Methoxybenzaldehyd (224.8 μL , 1.84 mmol) umgesetzt.

Es wird nach Säulenchromatographie (Axel Semrau FlashMaster Cy/EE Gradient) 76 mg (23%) **BSc4519** als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc /Cy 1:1) = 0.60.

HPLC t_R = 7.57 min (90%).

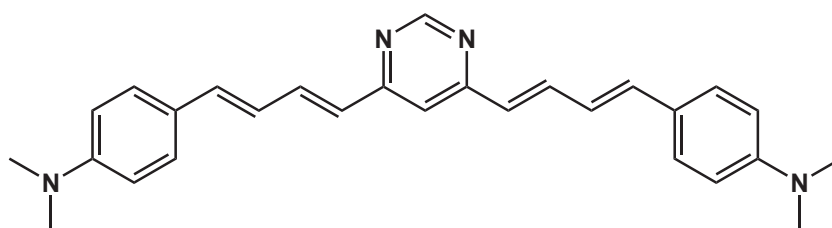
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.96 (s, 1H), 7.81 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.19 (s, 1H), 6.87-6.84 (m, 7H), 3.76 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 161.7, 159.8, 136.3, 129.6, 128.3, 127.3, 122.0, 113.3, 112.8, 54.3$ ppm.

MS (EI) $m/z = 343$ $[\text{M}-1]^+$, 328, 300.

Abs/Em_{max} = 380/483 nm.

4-((1E,3E)-4-(6-((1E,3E)-4-(4-(Dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)pyrimidin-4-yl)buta-1,3-dienyl)-N,N-dimethylbenzylamin (BSc4520)



Nach AAV 3.2.2.1 wird Zimtaldehyd (322 mg, 1.40 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (MeOH) und Abtrennung von nicht umgesetztem Aldehyd durch Hydrazin-scavenger Resin (1.0 g, 4.20 mmol in DCM (10 mL), 3h, RT) **BSc4520** 67 mg (17%) als roter Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc /Cy 1:1) = 0.37.

HPLC $t_R = 6.18$ min (91%).

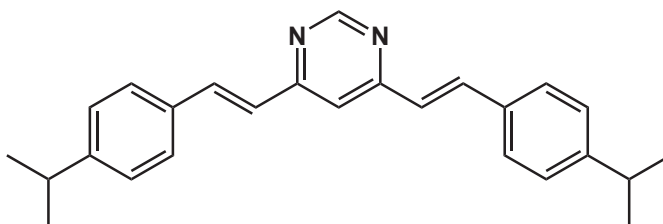
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 8.90$ (s, 1H), 7.59-7.54 (m, 2H), 7.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 6.98 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 5.1$ Hz, 4H), 6.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 6.41 (d, $J = 15.1$ Hz, 2H), 2.93 (s, 12H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 161.8, 157.5, 149.7, 137.7, 137.2, 127.3, 126.0, 123.9, 122.5, 114.3, 111.2, 39.3$ ppm.

MS (EI) $m/z = 422.6$ $[\text{M}]^+$, 407.6, 302.4.

Abs/Em_{max} = 315/456 nm.

4,6-Bis(4-isopropylstyryl)pyrimidin (BSc4522)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4 Isopropylbenzaldehyd (274 mg, 1.84 mmol) umgesetzt.

Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, in DCM (7 mL) gelöst und 3 h über PsNNH_2 *scavenger resin* geschüttelt, um den nicht umgesetzten Aldehyd zu entfernen. Es wird 245 mg (72%) **BSc4522** als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.70.

HPLC t_R = 9.50 min (98%).

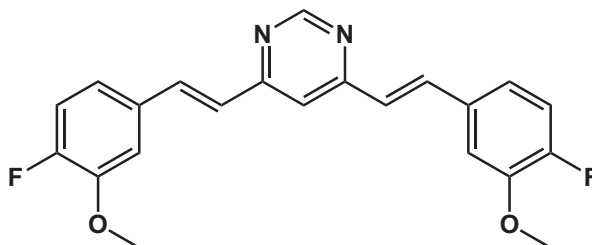
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 7.87 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.26-7.24 (m, 5H), 7.02 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 2.92 (td, J = 13.8, 6.9, 6.9 Hz, 2H), 1.26 (d, J = 6.9 Hz, 12H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 162.9, 158.7, 150.6, 137.0, 133.4, 129.0, 127.8, 127.0, 125.0, 116.1, 34.1, 23.8 ppm.

MS (EI) m/z = 367 $[\text{M}-1]^+$, 351, 325.

Abs/ Em_{max} = 325/436 nm.

4,6-Bis(4-fluoro-3-methoxystyryl)pyrimidin (BSc4528)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4,6-Dimethylpyrimidin (115 mg, 1.06 mmol) mit 4-Fluoro-3-methoxybenzaldehyd (327 mg, 2.12 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie 25 mg (6%) **BSc4528** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.68.

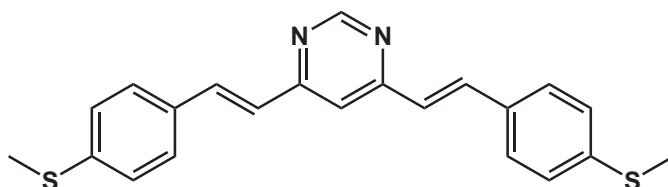
HPLC t_R = 8.55 min (90%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.03 (s, 1H), 7.77 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.21 (s, 1H), 7.15-7.00 (m, 7H), 6.96 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 162.6, 158.7, 154.9, 151.6, 148.0, 136.2, 132.3, 125.5, 120.9, 116.4, 112.1, 56.2 ppm.

MS (EI) m/z = 379.2 $[\text{M}]^+$, 337.2.

4,6-Bis(4-(methylthio)styryl)pyrimidin (BSc4311)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4,6-Dimethylpyrimidin (150 mg, 1.38 mmol) mit 4-(Methylthio)-benzaldehyd (422 mg, 2.77 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie 193 mg (37%) **BSc4311** erhalten.

R_f (EtOAc /Cy 1:1) = 0.60.

HPLC t_R = 8.95 min (96%).

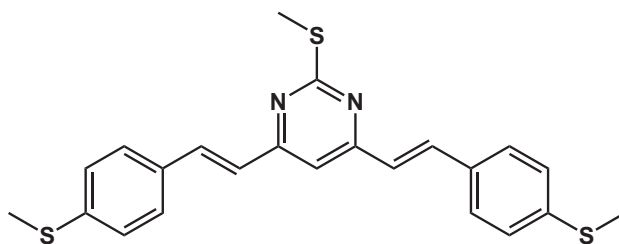
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 7.86 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.27-7.24 (m, 5H), 7.02 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 2.52 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 162.7, 158.6, 140.7, 136.4, 132.4, 128.0, 126.2, 124.9, 116.2, 15.4 ppm.

MS (EI) m/z = 375.5 $[\text{M}-1]^+$, 360.4.

Abs/ Em_{max} = 379/520 nm.

4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(2-Methylthio)pyrimidin-4,6-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)diphenol (BSc4523)



BSc4226 (15 mg, 0.04 mmol) wird unter Argon-Schutzgasatmosphäre in DCM (trocken; 4 mL) gelöst, Bromtribromid (18.4 μ L, 0.19 mmol) wird zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegeben, mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung (3x 50 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 12 mg (87%) **BSc4523** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.41.

HPLC t_R = 6.96 min (94%).

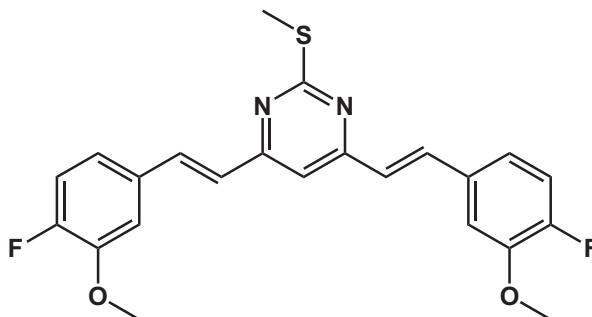
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.10 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.00 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 2.82 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 162.4, 145.6, 132.0, 127.7, 118.7, 118.5, 117.2, 110.7, 14.0 ppm.

MS (EI) m/z = 362 $[\text{M}]^+$, 347, 315.

Abs/ Em_{max} = 384/484 nm.

4,6-Bis(4-fluoro-3-methoxystyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4524)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4-Fluoro-3-methoxybenzaldehyd (200 mg, 1.29 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie 88 mg (16%) **BSc4524** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.66.

HPLC t_R = 9.51 min (84%).

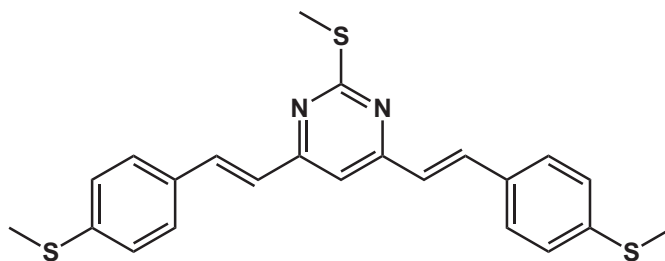
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.73 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.04 (dd, J = 7.7, 4.7 Hz, 4H), 6.86 (s, 2H), 6.80 (s, 1H), 3.87 (s, 6H), 2.60 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.1, 161.6, 153.8, 150.5, 147.0, 135.1, 131.4, 124.6, 119.8, 115.4, 110.8, 55.2, 13.3 ppm.

MS (EI) m/z = 426 $[\text{M}]^+$, 393, 290.

Abs/ Em_{max} = 329/454 nm.

4,6-Bis-(4-(methylthio)styryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4527)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (150 mg, 0.97 mmol) mit 4-(Methylthio)benzaldehyd (296 mg, 1.94 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (EtOAc) 75 mg (39%) **BSc4527** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.71.

HPLC t_R = 10.49 min (96%).

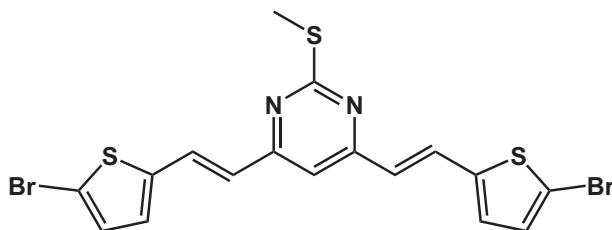
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.83 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.25 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.97 (s, 1H), 6.90 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.51 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.9, 162.7, 140.4, 136.3, 132.4, 128.0, 126.1, 124.9, 111.9, 15.3, 14.3 ppm.

MS (EI) m/z = 422 $[\text{M}]^+$, 407, 375, 358.

Abs/ Em_{max} = 376/500 nm.

4,6-Bis((*E*)-2-(5-bromothiophen-2-yl)vinyl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4309)



Nach AAV 3.2.2.1 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)-pyrimidin (150 mg, 0.97 mmol) mit 5-Bromothiophen-2-carbaldehyd (372 mg, 1.95 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (Axel Semrau FlashMaster Cy/EE Gradient) 189 mg (39%) **BSc4309** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.30.

HPLC t_R = 10.90 min (92%).

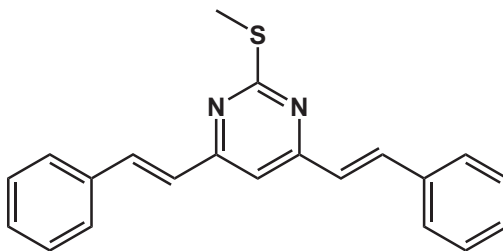
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.88 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 7.01-6.96 (m, 4H), 6.75 (s, 1H), 6.64 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 2.64 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 172.0, 162.1, 142.9, 131.0, 129.7, 129.1, 125.1, 114.4, 112.3, 14.2 ppm.

MS (EI) m/z = 500 $[\text{M}]^+$.

Abs/ Em_{max} = 370/466 nm.

2-(Methylthio)-4,5-distyrylpyrimidin (BSc4227)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)-pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit Benzaldehyd (69 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (MeOH) 18 mg (19%) **BSc4227** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:4) = 0.49.

HPLC t_R = 9.84 min (91%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.91 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.61 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 4H), 7.40-7.37 (m, 6H), 7.08 (s, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H) ppm.

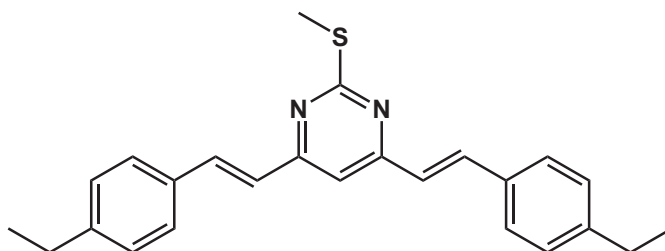
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.6, 162.6, 137.7, 135.6, 129.5, 128.8, 127.7, 125.3, 111.7, 14.2 ppm.

MS (EI) m/z = 330 $[\text{M}]^+$, 298, 256, 186.

SMP = 152°C.

Abs/ Em_{max} = 397/464 nm.

4,6-Bis(4-ethylstyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4224)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 4-Ethylbenzaldehyd (87 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/1) 22 mg (27%) **BSc4224** als hellgelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.47.

HPLC t_R = 10.93 min (89%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.89 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.24 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.04 (s, 1H), 6.98 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 2.72-2.63 (m, 7H), 0.88 (dd, J = 13.6, 6.5 Hz, 6H) ppm.

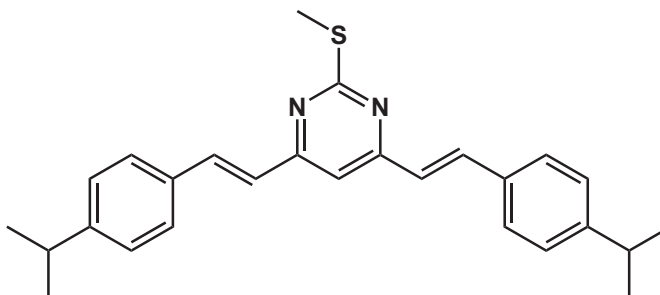
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 172.3, 162.7, 146.1, 137.6, 133.1, 128.4, 127.8, 124.3, 11.4, 28.78, 15.3, 14.1 ppm.

MS (EI) m/z = 386 $[\text{M}]^+$, 270.

SMP = 85°C.

Abs/ Em_{max} = 319/470 nm.

4,6-Bis(4-isopropylstyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4225)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 4-Isopropylbenzaldehyd (94 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/10) 45 mg (34%) **BSc4225** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:10) = 0.45.

HPLC t_R = 11.23 min (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.79 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 7.18 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 6.90 (d, J = 14.9 Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 2.87-2.73 (m, 2H), 2.59 (s, 3H), 1.20-1.85 (m, 12H) ppm.

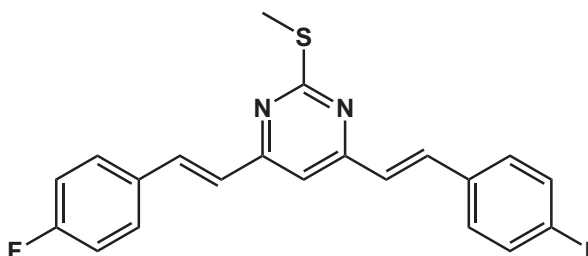
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 117.9, 163.2, 151.0, 137.8, 133.7, 128.2, 127.2, 125.0, 111.9, 34.4, 24.2, 14.5 ppm.

MS (EI) m/z = 415 $[\text{M}]^+$, 382, 354.

SMP = 135°C.

Abs/ Em_{max} = 340-390/482 nm.

4,6-Bis(4-fluorostyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4229)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 4-Fluorbenzaldehyd (80 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie 45 mg (38%) **BSc4229** erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:1) = 0.39.

HPLC t_R = 9.85 min (74%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.8 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.53-7.48(m, 4H), 7.19 (s, 1H), 7.04-6.98 (m, 4H), 6.88 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 2.6 (s, 3H) ppm.

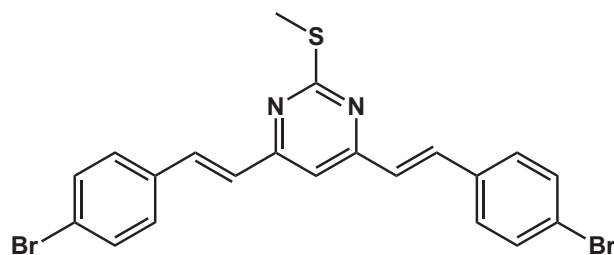
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 171.5, 162.5, 161.8, 131.8, 131.8, 129.5, 129.4, 124.8, 116.1, 115.8, 111.7, 14.1 ppm.

MS (EI) m/z = 366 $[\text{M}]^+$, 319, 260 147.

SMP = 157°C.

Abs/ Em_{max} = 400/510 nm.

4,6-Bis(4-bromostyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4228)



Nach AAV 3.2.2 wird 4-Bromobenzaldehyd (240 mg, 1.30 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/5) 55 mg (36%) **BSc4228** als gelb-orangener Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:5) = 0.42.

HPLC t_R = 10.87 min (88%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.84 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.55-7.50 (m, 4H), 7.42-7.37 (m, 4H), 7.01 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 2.67 (s, 3H) ppm.

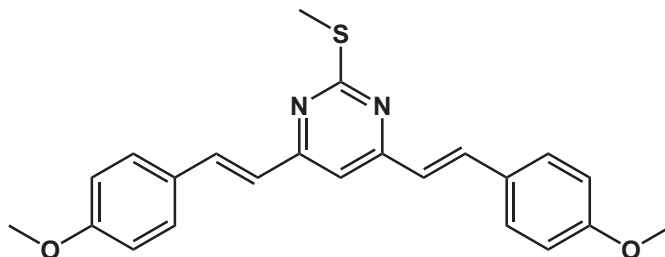
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 172.3, 162.8, 134.9, 132.6, 132.4, 129.6, 129.5, 124.1, 112.5, 14.6 ppm.

MS (EI) m/z = 489 $[\text{M}]^+$, 323, 240.

SMP = 240°C.

Abs/ Em_{max} = 354/426 nm.

4,6-Bis(4-methoxystyryl)-2-(methylthio)pyrimidin (BSc4226)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 4-Methoxybenzaldehyd (88 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (DCM) 81 mg (64%) **BSc4226** als gelb-orangener Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:4) = 0.46.

HPLC t_R = 9.60 min (91%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.82 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.87 (d, J = 14.9 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 3.83 (s, 6H), 2.66 (s, 3H) ppm.

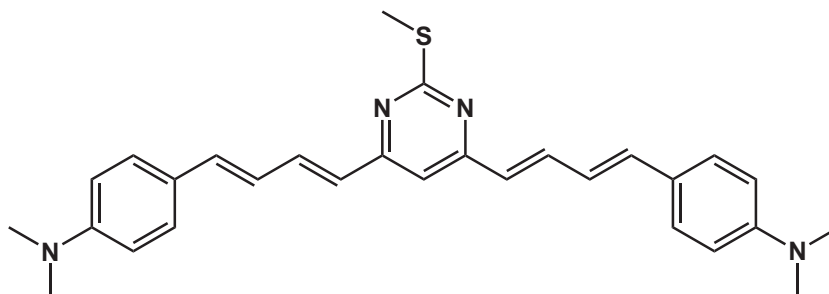
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 117.4, 161.2, 160.6, 136.8, 129.2, 128.5, 114.3, 111.3, 55.3, 14.1 ppm.

MS (EI) m/z = 391 $[\text{M}]^+$.

SMP = 165°C.

Abs/ Em_{max} = 380/470 nm.

4-((1E,3E)-4-(6-((1E,3E)-4-(4-(dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)-2-(methylthio)pyrimidin-4-yl)buta-1,3-dienyl)-N,N-dimethylbenzylamin (BSc4223)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 4-Dimethylaminozimtaldehyd (114 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/1) 36 mg (24%) **BSc4223** als dunkelroter Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy 1:4) = 0.40.

HPLC t_R = 7.13 min (65%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.89 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 17.4, 9.7 Hz, 2H), 7.55 (dd, J = 8.9, 2.9 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.90-6.86 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 6.59-6.52 (m, 2H), 3.06 (s, 12H), 2.67 (s, 3H) ppm.

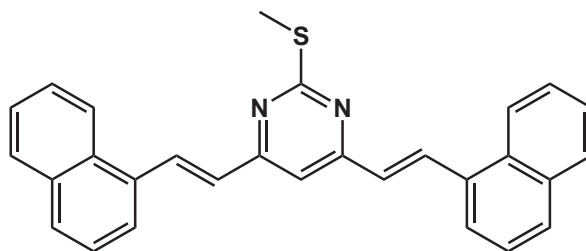
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 171.9, 161.9, 150.7, 140.5, 137.4, 129.5, 128.4, 112.7, 110.2, 37.9, 14.3 ppm.

MS (EI) m/z = 468 $[\text{M}]^+$.

SMP: 130°C.

Abs/ Em_{max} = 453/588 nm.

2-(Methylthio)-4,6-bis((*E*)-2-(naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin (BSc4326)



Nach AAV 3.2.2 wird 4,6-Dimethyl-2-(methansulfanyl)pyrimidin (50 mg, 0.32 mmol) mit 1-Naphtylaldehyd (101 mg, 0.65 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1:3) 39 mg (29%) **BSc4326** als brauner Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc / Cy 1:3) = 0.45.

HPLC t_R = 11.21 min (85%).

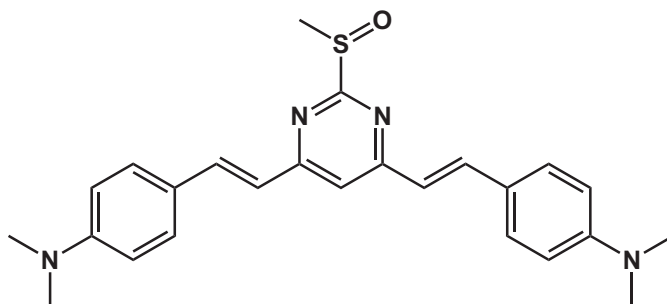
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.68 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 7.52-7.39 (m, 14H), 7.04 (s, 1H), 6.97 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 2.66 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 172.8, 162.7, 136.6, 134.5, 133.7, 133.2, 131.5, 129.8, 128.7, 128.7, 126.6, 126.1, 125.6, 125.6, 125.2, 112.4, 14.35 ppm.

MS (EI) m/z = 431 $[\text{M}]^+$, 383.

Abs/ Em_{max} = 386/460 nm.

4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(2-(Methylsulfinyl)pyrimidin-4,6-diyl)-bis-(ethene-2,1-diyl)-bis-(*N,N*-dimethylanilin) (BSc4187)



BSc4097 (50 mg, 0.12 mmol) wird in DCM (3 mL) gelöst, mit 3-Chlorperbenzoesäure (23 mg, 0.13 mmol) versetzt und für 3 h bei RT gerührt. Es wird bei der Zugabe der Säure ein Farbumschlag von gelb nach rot beobachtet. Nach 3 h wird erneut 3-Chlorperbenzoesäure (23 mg, 0.13 mmol) zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird Säulenchromatographisch (EtOAc/Cy; 1:2) gereinigt. Es werden 50 mg (95%) rotes Öl von **BSc4187** als Produkt erhalten

R_f (EtOAc/Cy 1:3) = 0.06

HPLC t_R = 5.04 min (85%).

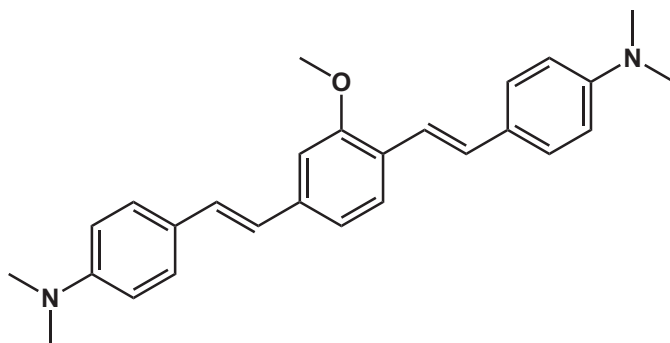
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.90 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.14 (s, 1H), 6.90 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.78 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 3.04 (s, 12H), 3.00 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 172.8, 164.6, 138.7, 129.5, 120.5, 114.8, 112.7, 40.6, 40.2 ppm.

MS (EI) m/z = 455.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 433.2, 129.

Abs/ Em_{max} = 472/578 nm.

4-(4-(4-(Dimethylamino)styryl)-3-methoxystyryl)-*N,N*-dimethylbenzamin (BSc4076)



Nach AAV 3.2.1 wird 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (75 mg, 0.5 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1:1.5) **BSc4076** 12 mg (12%) als oranges Produkt erhalten.

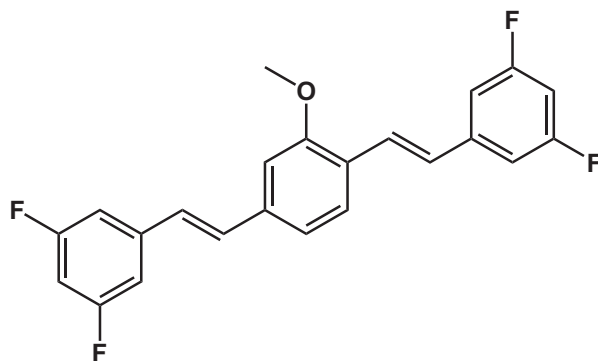
R_f (EtOAc/Cy; 1:2) = 0.31.

HPLC t_R = 4.26 min (90%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.37 (m, 4H), 7.25 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.06-6.99 (m, 4H), 6.83-6.75 (m, 3H), 6.64 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.96 (s, 12H) ppm.

MS (EI) m/z = 398.4 $[\text{M}]^+$.

1-(4-(3,5-Difluorostyryl)-3-methoxystyryl)-3,5-difluorobenzol (BSc4184)



Nach AAV 3.2.1 wird Tertaethyl (2-methoxy-1,4-phenylen)bis(methylen) diphosphonat (50 mg, 0.12 mmol) mit 3,5-Difluorobenzaldehyd (30 mg, 0.20 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1/3) **BSc4182** 31 mg (61%) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:2) = 0.60.

HPLC t_R = 10.28 min (90%).

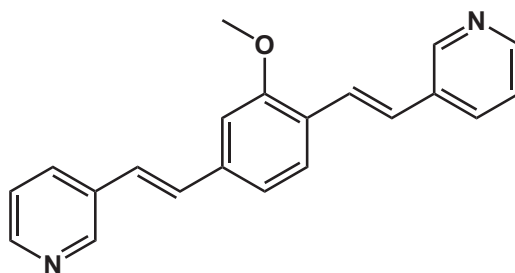
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.05-7.02 (m, 2H), 6.99-6.91 (m, 7H), 6.65-6.58 (m, 2H), 3.88 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 163.3, 163.2, 161.3, 161.2, 156.4, 140.4, 139.6, 136.6, 129.9, 126.1, 125.9, 124.6, 118.6, 108.2, 108.1, 108.0, 107.9, 101.9, 101.9, 101.3, 54.6 ppm.

MS (EI) m/z = 384 $[\text{M}]^+$.

Abs/ Em_{max} = 369/433 nm.

3-(3-Methoxy-4-((*E*)-2-(pyridin-3-yl)vinyl)styryl)pyridin (BSc4358)



Nach AAV 3.2.1 wird Nicotinaldehyd (54 mg, 0.5 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 10:0.5) **BSc4358** 17 mg (22%) als gelbes Öl erhalten.

R_f (EtOAc /Cy; 1:1) = 0.51.

HPLC t_R = 1.44 min (90 %).

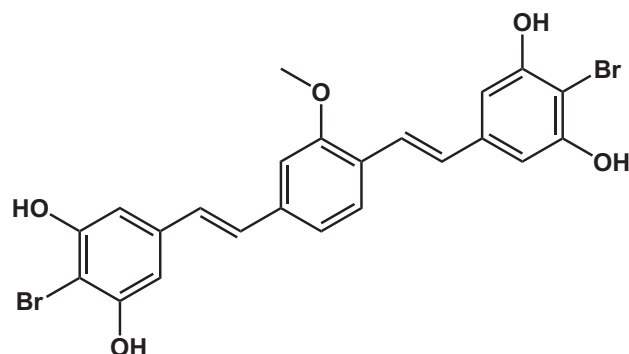
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.76 (s, 2H), 8.51 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 7.37-7.32 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 5H), 3.98 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 155.9, 146.5, 146.4, 145.7, 145.3, 136.4, 132.7, 132.3, 131.7, 129.5, 125.5, 124.6, 124.2, 123.5, 123.3, 122.4, 122.2, 118.1, 107.4, 54.1 ppm.

MS (ESI) m/z = 314 $[\text{M}]^+$, 299.

Abs/ Em_{max} = 368/430 nm.

4-(4-(3,5-Dibromo-4-hydroxystyryl)-3-methoxystyryl)-2,6-dibromophenol (BSc4185)



Nach AAV 3.2.1 wird 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzaldehyd (116 mg, 0.41 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (EtOAc/Cy/MeOH; 1.5/1/0.3) **BSc4185** 21 mg (13%) als grün gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.83.

HPLC t_R = 9.85 min (90 %).

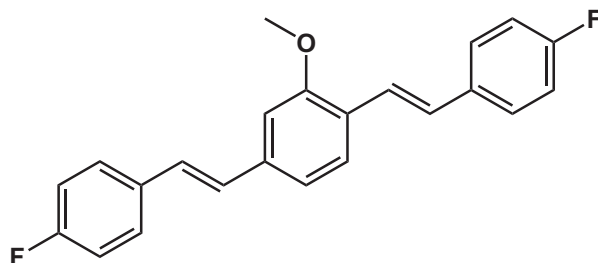
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 7.81 (s, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 10.6 Hz, 3H), 7.15 (dd, J = 16.0, 12.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 156.7, 150.0, 149.8, 137.7, 132.5, 132.0, 130.0, 129.8, 128.3, 126.7, 125.9, 125.8, 124.7, 122.9, 119.2, 112.3, 109.1, 55.5 ppm.

MS (EI) m/z = 660 $[M]^+$.

Abs/ Em_{max} = 375/417-440 nm.

1,4-Bis(4-fluorostyryl)-2-methoxybenzol (BSc4356)



Nach AAV 3.2.1 wird 4-Fluorobenzaldehyd (52 mg, 0.41 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1:6) **BSc4356** 51 mg (61%) als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.90.

HPLC t_R = 10.13 min (80 %).

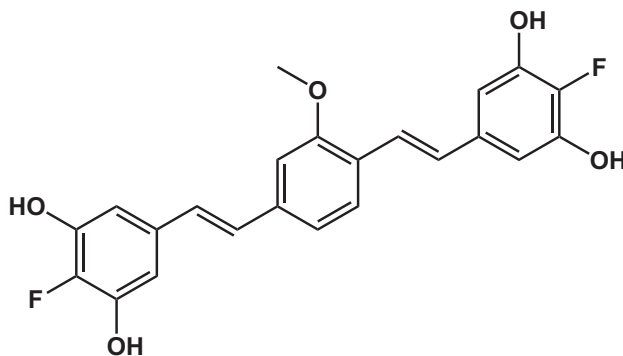
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.51-7.46 (m, 4H), 7.38 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 7.12-7.09 (m, 2H), 7.06-7.02 (m, 6H), 6.90-6.87 (m, 1H), 3.95 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 161.4, 157.1, 137.8, 134.2, 133.4, 128.3, 128.3, 128.0, 128.0, 127.8, 127.8, 127.5, 126.5, 125.9, 122.9, 119.3, 115.8, 115.6, 115.4, 114.7, 108.7, 55.6 ppm.

MS (EI) m/z = 348 $[\text{M}]^+$.

Abs/ Em_{max} = 368/428 nm.

4-(4-(3,5-Difluoro-4-hydroxystyryl)-3-methoxystyryl)-2,6-difluorophenol (BSc4186)



Nach AAV 3.2.1 wird 3,5-Difluoro-4-dihydroxybenzaldehyd (66 mg, 0.41 mmol) umgesetzt. Es wird nach Umkristallisation (EtOH) **BSc4186** 80 mg (90%) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.59.

HPLC t_R = 7.93 min (81 %).

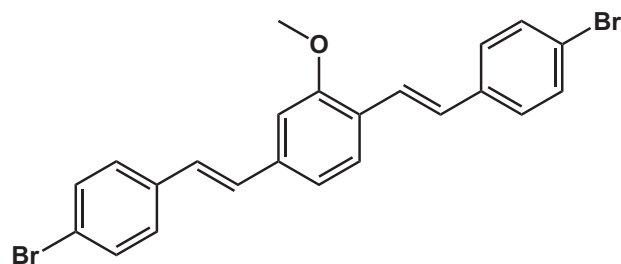
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.41 (d, J = 8.01 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 156.0, 152.7, 150.7, 136.5, 132.8, 132.7, 132.4, 128.1, 128.0, 127.2, 127.1, 127.0, 126.0, 125.8, 125.5, 125.1, 124.5, 121.7, 118.2, 108.4, 107.6, 54.5 ppm.

MS (EI) m/z = 416 $[\text{M}]^+$, 276.

Abs/ Em_{max} = 396/441 nm.

1,4-Bis(4-bromostyryl)-2-methoxynezol (BSc4218)



Nach AAV 3.2.1 wird 4-Dibromobenzaldehyd (88 mg, 0.48 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1:6) **BSc4185** 80 mg (70%) als grün gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.83.

HPLC t_R = 9.85 min (90 %).

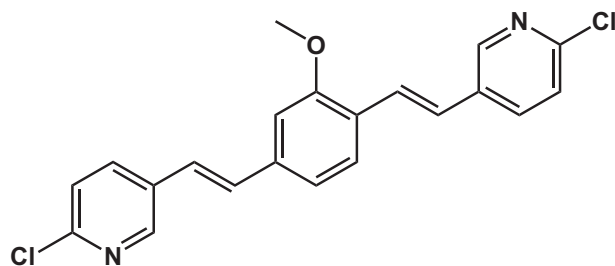
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 4H), 7.32-7.29 (m, 4H), 7.04 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 2H), 7.00-6.93 (m, 4H), 3.87 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 157.2, 137.8, 136.9, 136.1, 131.8, 131.7, 129.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 126.7, 125.8, 123.8, 121.4, 121.1, 119.4, 108.8, 55.6 ppm.

MS (EI) m/z = 470 (468, 472) $[\text{M}]^+$.

Abs/ Em_{max} = 337/438 nm.

5-(4-((E)-2-(6-Chloropyridin-3-yl)vinyl)-2-methoxystyryl)-2-chloropyridin (BSc4082)



Nach AAV wird Tertaethyl (2-methoxy-1,4-phenylen)bis(methylen)diphosphonat (43 mg, 0.105 mmol) mit 6-Chloropyridin-3-carbaldehyd (27 mg, 0.19 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy; 1:6) **BSc4082** 30 mg (62%) als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.80.

HPLC t_R = 9.33 min (87 %).

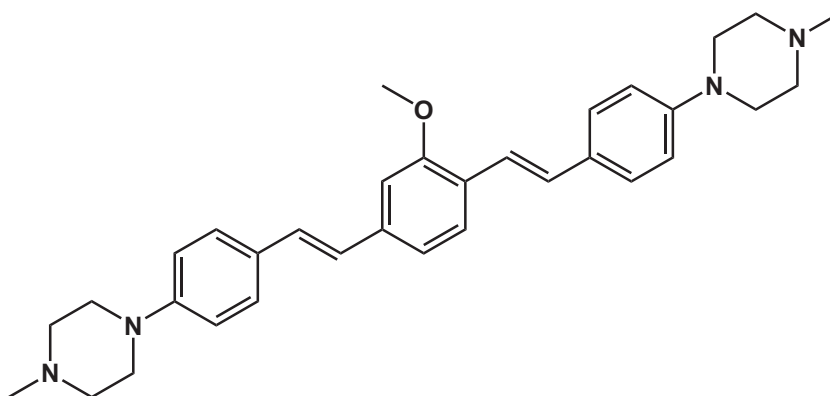
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.43 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.78-7.73 (m, 2H), 7.51 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.08-7.06 (m, 2H), 7.04 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.90 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 156.3, 149.1, 148.8, 147.3, 147.2, 136.7, 134.3, 134.2, 131.6, 130.9, 130.1, 126.1, 124.9, 124.8, 123.3, 123.2, 123.1, 122.9, 118.6, 107.9, 54.6 ppm.

MS (EI) m/z = 382 $[\text{M}]^+$, 367.

Abs/ Em_{max} = 326/441 nm.

1-(4-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)styryl)-2-methoxystyryl)phenyl)-4-methylpiperazin (BSc4357)



Nach AAV 3.2.1 wird 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)benzaldehyd (95 mg, 0.46 mmol) umgesetzt. Es wird nach Säulenchromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 8:1) **BSc4357** 42 mg (34%) als gelber Feststoff erhalten.

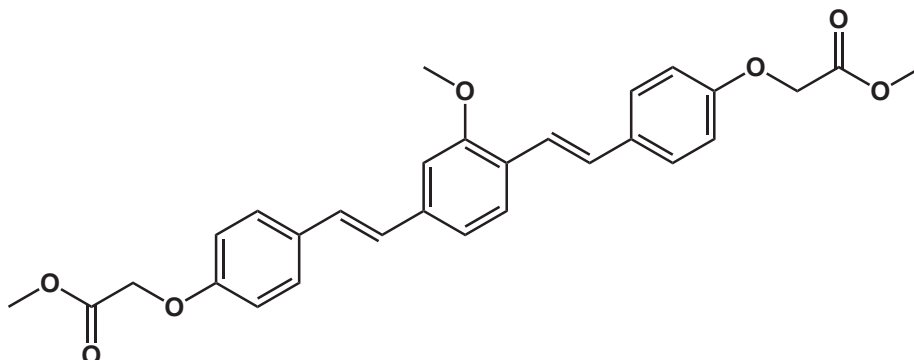
R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1: 0.1) = 0.30.

HPLC t_R = 4.65 min (83 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, J = 8.2, 8.2 Hz, 4H), 7.32 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 7.05-7.02 (m, 5H), 6.93-6.88 (m, Hz, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.36-3.30 (m, 8H), 2.72-2.67 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125MHz) δ = 155.8, 149.3, 149.0, 136.8, 128.9, 128.0, 127.3, 127.0, 126.5,

2,2'-(4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(2-methoxy-1,4-phenylen)bis(ethendiyl)bis(4,1-phenylen))bis(oxy)diacetat (BSc4308)



In einem am Hochvakuum getrockneten und ausgeheizten Wheatonvial mit Septum (2.5 mL) werden unter Argon Schutzgasatmosphäre **BSc3924** (20 mg, 0.058 mmol), Kaliumcarbonat (17.66 mg, 0.128 mmol) und Aceton (1,5 mL) vorgelegt und bei RT 30 min gerührt. Bromesigsäuremethylester (17.75 mg, 0.116 mmol) in Aceton (1 mL) gelöst wird vorsichtig zuge tropft und die Reaktionslösung für 18 Stunden bei 60°C zum Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und anschließend Chromatographisch aufgereinigt. Es wird **BSc4308** 9 mg, (32%) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.43.

HPLC t_R = 9.05 min (63%).

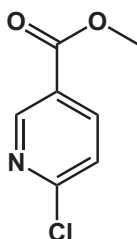
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.47 (d, J = 8.14 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.03 (dd, J = 8.14, 1.5 Hz Hz, 1H), 7.01 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 168.4, 168.3, 168.3, 156.5, 156.4, 156.2, 155.9, 136.8, 131.0, 130.3, 127.1, 126.8, 126.7, 126.2, 125.3, 124.9, 120.8, 118.2, 113.9, 113.8, 107.6, 64.4, 64.3, 54.5, 51.3, 51.2 ppm.

MS (EI) m/z = 488 $[\text{M}]^+$.

Abs/ Em_{max} = 350/437 nm.

Methyl-6-chloropyridin-3-carboxylat



6-Chloronicotinsäure (3.00 g, 19.3 mmol) wird in Methanol (40 mL) suspendiert, auf 0°C gekühlt und Thionylchlorid (3.38 mL, 28.6 mmol) vorsichtig zugetropft. Die Reaktionslösung wird im Anschluss 30 min bei 0°C, 2 h bei RT und 1 h zum Rückfluss gerührt. Es wird Kaliumcarbonat (1.32 g, 9.5 mmol) zugegeben, 3 h zum Rückfluss erhitzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eis gegeben mit DCM (3x 90 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird nach Umkristallisation (EtOAc/Cy, 1:5) Methyl-6-chloropyridin-3-carboxylat 2.87 g (87%) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.87.

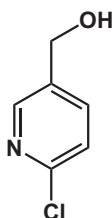
HPLC t_R = 4.07 min (98%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 8.97 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H), 8.22 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 164.9, 155.7, 151.2, 139.6, 125.0, 124.2, 52.6 ppm.

SMP: 80°C.

(6-Chloropyridin-3-yl)methanol

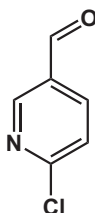


Eine Lösung von Methyl-6-chloropyridin-3-carboxylat (308 mg, 1.80 mmol) in THF (4 mL) wird bei 0°C 30 min gerührt, dann wird Natriumborhydrid (275 mg, 7.20 mmol) zugegeben und weitere 30 min gerührt. Im Anschluss wird tropfenweise Methanol (1.8 mL) bei 0°C zugegeben

und weitere 2 h gerührt. Es wird HCl_{aq} (20 mL, 1M) zugegeben und der Niederschlag abfiltriert. Die Lösung wird im Vakuum eingengt, mit DCM (5x 20 mL) extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung (3x 30 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird (6-Chloropyridin-3-yl)methanol 178 mg (69%) als Produkt erhalten und direkt weiter zu 6-Chloropyridin-3-carbaldehyd umgesetzt.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = 0.15.

6-Chloropyridin-3-carbaldehyd



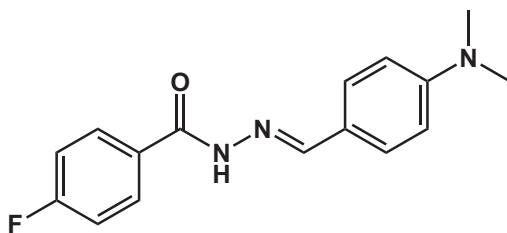
Zu einer Lösung von Oxalylchlorid (318 μL , 3.73 mmol) in DCM (8 mL) wird bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ tropfenweise DMSO (5.28 mL) zugegeben und 30 min gerührt. Anschließend wird (6-Chloropyridin-3-yl)methanol (178 mg, 1.24 mmol) in DCM (1 mL) gelöst zugegeben, weitere 30 min gerührt und im Anschluss Triethylamin (15.4 mL) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird mit Diethylether (40 mL) verdünnt, mit ges. NaHCO_3 -Lösung (4x 25 mL) und ges. NaCl-Lösung (4x 25 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird nach Säulenchromatographie (CHCl_3) 6-Chloropyridin-3-carbaldehyd (63 mg, 36%) als Produkt erhalten.

HPLC t_R = 2.60 min (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 10.03 (s, 1H), 8.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 4.4, 3.8 Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 188.2, 155.9, 151.4, 137.0, 129.4, 124.2 ppm.

(*E*)-*N*'-(4-(Dimethylamino)benzyliden)-4-fluorobenzhydrazid (BSc4521)



4-Fluorobenzhydrazid (500 mg, 3.24 mmol) und 4-Dimethylaminobenzaldehyd (483 mg, 3.24 mmol) werden in MeOH (15 mL) gelöst und 30 min in der Mikrowelle bei 140°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wird der Niederschlag abfiltriert und mit wenig kaltem MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird **BSc4521** 106 mg (11%) als Produkt erhalten.

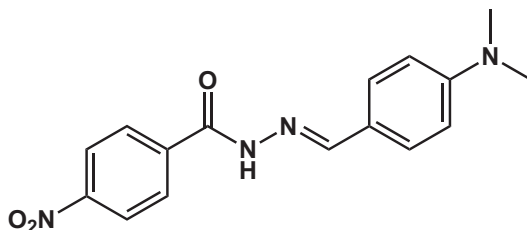
R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) = 0.76.

HPLC t_R = 4.70 min (92%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ = 9.91 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.01 (m, 4H), 6.72 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ = 156.9, 153.8, 150.3, 142.6, 137.9, 126.8, 123.5, 115.6, 115.3, 112.5, 112.4, 112.1 ppm.

(*E*)-*N*'-(4-(Dimethylamino)benzyliden)-4-nitrobenzhidrazid (BSc3996)



4-Nitrobenzhidrazid (500 mg, 3.24 mmol) und 4-Dimethylaminobenzaldehyd (411 mg, 3.24 mmol) werden in MeOH (15 mL) gelöst und 30 min in der Mikrowelle (140°C) erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wird der Niederschlag abfiltriert und mit kaltem MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird nach Umkristallisation (EtOH) **BSc3996** 415 mg (48%) als Produkt erhalten.

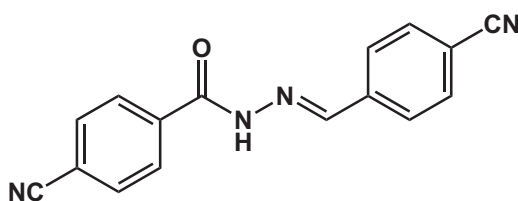
R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) = 0.80.

HPLC t_R = 5.37 min (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ = 11.04 (s, 1H), 8.10 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 2.96 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ = 151.0, 150.8, 143.2, 137.4, 127.8, 126.2, 122.0, 111.9, 110.7 ppm.

(*E*)-4-Cyano-*N*-(4-cyanobenzyliden)benzohydrazid (BSc4360)



4-Cyanobenzohydrazid (1.4 g, 8.7 mmol) und 4-Cyanobenzaldehyd (1.1 g, 8.7 mmol) werden in MeOH (15 mL) gelöst und 30 min in der Mikrowelle bei 140°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wird der Niederschlag abfiltriert, mit wenig kaltem MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird **BSc4360** 2.3 g (96%) als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EE/Cy 5:1) = 0.35.

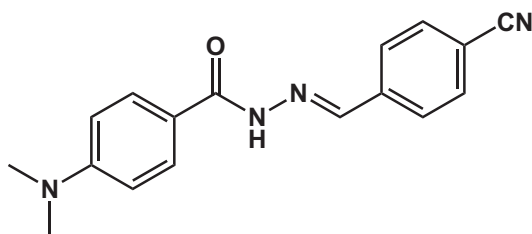
HPLC t_R = 5.1 min (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 12.28 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.04-8.00 (m, 8H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 161.9, 146.7, 138.5, 137.1, 132.7, 132.5, 128.5, 127.7, 118.5, 118.2, 114.2, 112.1 ppm.

MS (EI) m/z = 274 $[\text{M}]^+$, 146, 130, 102.

(E)-N ,-(4-Cyanobenzyliden)-4-(dimethylamino)benzohydrazid (BSc4359)



4-Dimethylaminobenzohydrazid (1.5 g, 8.4 mmol) und 4-Cyanobenzaldehyd (1.1 g, 8.4 mmol) werden in MeOH (15 mL) gelöst und 30 min in der Mikrowelle bei 140°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wird der Niederschlag abfiltriert, mit wenig kaltem MeOH gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird **BSc4359** 2.3 g (95%) als weißer Feststoff erhalten.

R_f (EE/Cy 5:1) = 0.45.

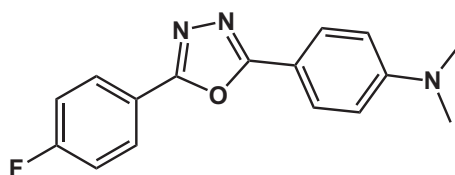
HPLC t_R = 4.95 min (97 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 11.78 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.90-7.87 (m, 4H), 7.83 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 3.00 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 152.6, 143.8, 143.5, 139.2, 132.7, 129.3, 127.3, 119.0, 118.7, 111.4, 110.7, 39.6 ppm.

MS (EI) m/z = 292 $[\text{M}]^+$, 148.

4-(5-(4-Fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N,N-dimethylbenzamin (BSc4559)



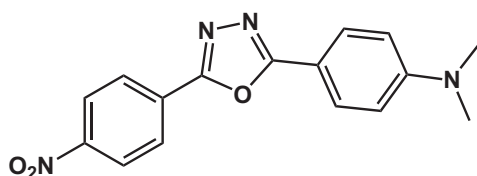
BSc4521 (40 mg, 0.14 mmol) und Dess-Martin-Periodinan (149 mg, 0.35 mmol) werden unter Argonatmosphäre in DMF (2 mL, trocken) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc (30 mL) aufgenommen und sukzessive mit H_2O (3x 20 mL), ges. NaCl-Lösung (3x 20 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es wird **BSc4559** 30 mg (75 %) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) = 0.66.

HPLC t_R = 7.78min (92%).

MS (EI) m/z = 282 $[M-1]^+$.

***N,N*-Dimethyl-4-(5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamin (BSc4525)**



BSc3996 (40 mg, 0.13 mmol) und Dess-Martin-Periodinan (136 mg, 0.32 mmol) werden unter Argonatmosphäre in DMF (3 mL, trocken) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1M NaOH-Lösung (20 mL) versetzt und mit EtOAc (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O (3x 20 mL), ges. NaCl-Lösung (3x 20 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) **BSc4525** 11 mg (27 %) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) = 0.76.

HPLC t_R = 9.57 min (> 80 %).

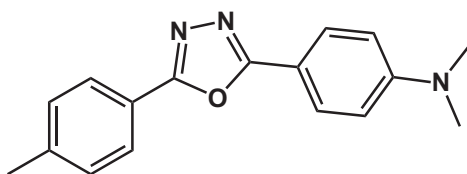
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 8.30 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.68 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 2.95 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 150.7, 147.8, 144.7, 141.3, 140.5, 129.0, 124.4, 123.6, 116.7, 112.8, 110.4, 40.9 ppm.

MS (EI) m/z = 310 $[M]^+$, 146.

Abs/Em_{max} = 342/470 nm.

***N,N*-Dimethyl-4-(5-*p*-tolyl-4H-pyrazol-3-yl)benzamin (BSc4526)**



4-Methylbenzhydrazid (75 mg, 0.50 mmol), 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (75 mg, 0.50 mmol) und Cerammoniumnitrat (274 mg, 0.50 mmol) werden in DCM (5 mL) suspendiert. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 24 h bei 50°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (3x 10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es wird nach Säulenchromatographie (EtOAc/Cy, 1/3) **BSc4526** 12mg (8%) als Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy/MeOH; 1:1:0.1) = 0.61.

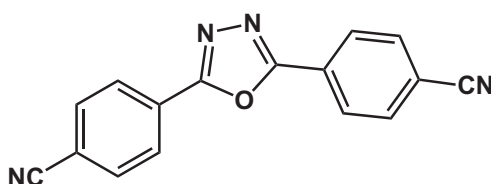
HPLC t_R = 7.66 min (> 80 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 7.97 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 3.32 (s, 6H), 3.03 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 164.8, 163.3, 152.7, 142.0, 130.2, 128.2, 127.1, 121.3, 112.1, 110.1, 29.4, 21.5 ppm.

MS (EI) m/z = 302.2 [M+Na]⁺, 276.2, 148.2.

***4,4'*-(1,3,4-oxadiazol-2,5-diyl)dibenzonitril (BSc4361)**



BSc4360 (1.5 g, 5.5 mmol) und 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) (3.85 g, 13.8 mmol) werden in DMF (15 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 30 min bei 120°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird **BSc4361** (1.03 g, 70%) als weißes Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:3) = 0.84.

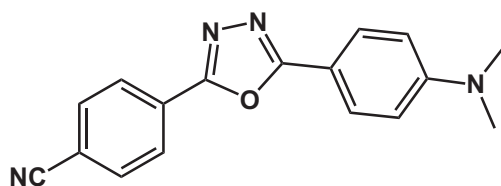
HPLC t_R = 6.78 min (95 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.34 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 8.10 (d, J = 8.6 Hz, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 164.0, 133.6, 128.0, 127.5, 118.2, 114.9 ppm.

MS (EI) m/z = 272 $[\text{M}]^+$, 216, 215, 130, 102.

4,4'-(1,3,4-oxadiazol-2,5-diyl)dibenzonitril (BSc4362)



BSc4359 (1.5 g, 5.1 mmol) und 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) (3.57 g mg, 12.8 mmol) werden in DMF (15 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 30 min bei 120°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und am Vakuum getrocknet. Es wird **BSc4362** (550mg, 37%) als rotbraunes Produkt erhalten.

R_f (EtOAc/Cy; 1:1) = . 0.32.

HPLC t_R = 6.4 min (42 %).

MS (EI) m/z = 290 $[\text{M}]^+$, 276, 148, 134.

Supporting Information

NSAID-derived γ -secretase modulators: Part IV: Isosteric replacements of a carboxylic acid on a carbazole scaffold

Nicole Höttecke^{#a}, Andrea Zall^{#a}, Daniel Kieser^a, Eva C. Naumann^a, Katrin Schneider^a, Dirk T. Steinbacher^a, Karlheinz Baumann^b, Robert Schubene^b,
Boris Schmidt.^{a*}

^a*Clemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstr. 22,
D-64287 Darmstadt, Germany, Fax: (+49) 6151-163278, E-mail: schmidt_boris@t-online.de*

^b*F. Hoffmann-La Roche Ltd., Pharmaceuticals Division, Preclinical Research CNS, Bldg. 70/345, CH-4070
Basel, Switzerland*

[#]*These authors contributed equally to this work*

Table of Contents:

1. General comments.
2. Experimental methods and spectral data of carboxylic acid isosteres on a carbazole scaffold.
3. *in vivo* mouse experiment.
4. HPLC data of the tested compounds.

1. General comments:

Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using aluminium sheets precoated with silica gel 60 F254 (0.2 mm; E. Merck). Chromatographic spots were visualized by UV and/or spraying with a methanolic solution of vanillin/H₂SO₄ or aq. KMNO₄ solution followed by heating. Silica gel chromatography was carried out using Merck silica gel 60 (0.063-0.2 mm). Melting Points were determined on a Mettler FP 51 melting point apparatus and are uncorrected. All reagents and solvents (THF, DMF, CH₂Cl₂, ethyl acetate, MeOH) were purchased at ABCR, Acros and Alfa Aesar, TCI, Sigma Aldrich and VWR. Methanol abs. was additionally dried over magnesium.

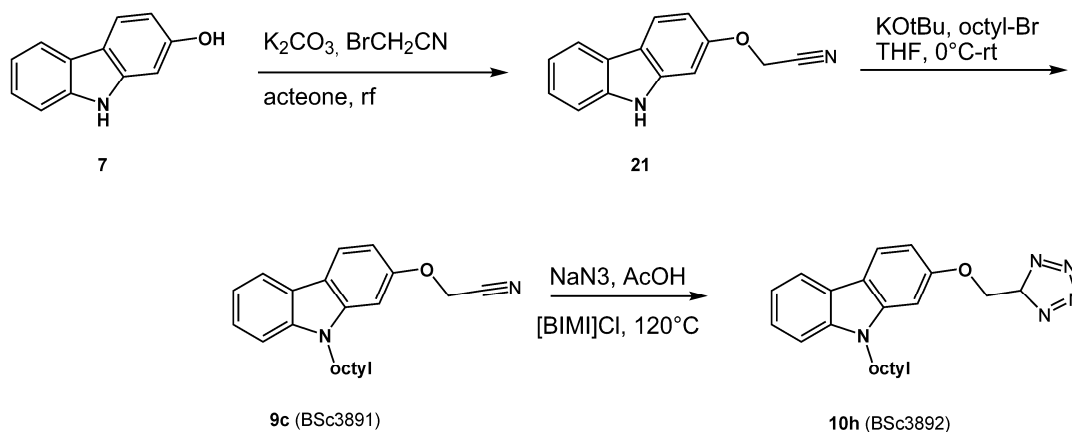
2. Experimental methods and spectral data of carboxylic acid isosteres on a carbazole scaffold:

2.1 General procedure for ether/ester formation:

To a suspension of anhydrous K₂CO₃ (3.0 eq.) in acetone or DMF was added 2-hydroxy-*N*-octyl-carbazole **8** (BSc4029) or a corresponding carboxylic acid **3/2** (BSc3030/BSc3039)¹⁴ (1 eq.) and the alkylhalogenide (1.5 eq.). The reaction mixture was heated under reflux until the reaction was completed (TLC control). The mixture was cooled to room temperature and filtered. The residue was washed with acetone (3×). The combined organic extract was evaporated *in vacuo* and purified by silica gel chromatography to yield the title compound.

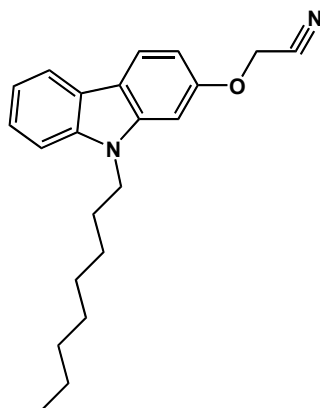
2.2 General procedure for reduction with LiAlH₄:

To a solution of the corresponding ester (1 eq.) in THF at -78°C was added LiAlH₄ (2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at -78°C until the reaction was completed (TLC control) and quenched by sequential addition of H₂O (1 mL by usage of 1 g LiAlH₄), 1M NaOH (2 mL by usage of 1 g LiAlH₄), H₂O (3 mL by usage of 1 g LiAlH₄). After stirring for 30 min the mixture was filtered through Celite, concentrated *in vacuo* and purified by silica gel chromatography to yield the title compound.



Scheme SI6: Detailed synthesis of **9c** (BSc3891) and **10h** (BSc3892).

2-(9-octyl-9H-carbazol-7-yloxy)acetonitrile **9c** (BSc3891)



According to general procedure 2.1: 2-Hydroxycarbazole (**7**) (1.500 g, 8.4 mmol), K_2CO_3 (3.45 g, 24.96 mmol), 2-bromoacetonitrile (0.806 mL, 10.1 mmol), acetone (20 mL).

Yield: 1.058 g (50%), colourless solid.

HPLC: 6.9 min (91%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 11.30 (s, 1H), 8.04 (dd, J = 8.1, 4.9 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.29 (m, 1H), 7.14 (dt, J = 7.0, 0.9 Hz, 2H), 6.88 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO): δ = 155.3, 140.5, 139.9, 124.6, 122.2, 121.1, 119.5, 118.7, 117.7, 116.8, 110.7, 107.8, 96.2, 53.9 ppm.

KOtBu (0.196 g, 2.69 mmol) was added to a stirred solution of THF (25 mL) 2-(9H-carbazol-7-yloxy)acetonitrile **21** (0.050 g, 0.19 mmol) at 0 °C. After 30 minutes octyliodide (0.606 mL, 3.36 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to stir at rt over night. The

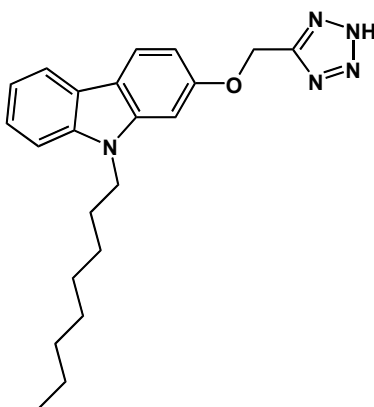
reaction mixture was quenched on ice water, extracted with Hexane (3x 50 mL), concentrated *in vacuo* and purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ethylester; 7:1) to give 0.063 g (30%) of **9c** (BSc3891) as yellowish oil.

HPLC: 7.35 min (91%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.08-7.96 (m, 2H), 7.50-7.35 (m, 2H), 7.29-7.17 (m, 1H), 6.98 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.25 (t, J = 7.2, 7.2 Hz, 2H), 1.87 (td, J = 14.8, 7.3 Hz, 2H), 1.48-1.18 (m, 10H), 0.88 (t, J = 6.7, 6.7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 155.8, 141.3, 140.9, 125.1, 122.5, 121.4, 119.8, 119.1, 118.9, 115.3, 108.6, 107.1, 95.6, 54.6, 43.2, 31.8, 29.3, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6, 14.0 ppm.

2-((2H-tetrazol-5-yl)methoxy)-9-octyl-9H-carbazole 10h (BSc3892)



9c (BSc3891) (0.029g, 0.08 mmol), sodium azide (0.017g, 0.26 mmol) and acetic acid (5 μ L) were suspended in 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-chlorid in an 2 mL Biotage InitiatorTM reaction vial. The reaction mixture was heated on the Biotage microwave at 140°C for 15 min.

The whole reaction mixture was soluted in 0.1N NaOH_{aq} and acidified dropwise with HCl_{conc.} until the product precipitates. Filtration gives 15mg colourless solid (50%) of **10h** BSc3892.

HPLC: 2.8 min (84%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.08-7.96 (m, 2H), 7.49-7.35 (m, 2H), 7.29-7.17 (m, 1H), 6.98 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 5.2 (s, 2H), 4.25 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (td, J = 14.8, 7.3 Hz, 2H), 1.48-1.18 (m, 10H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 155.8, 141.3, 140.9, 125.1, 122.5, 121.4, 119.8, 119.1, 118.9, 115.3, 108.6, 107.1, 95.6, 54.6, 43.2, 31.8, 29.3, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6, 14.0 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 377 [M]⁺.

(15 mL) and extracted with ethyl acetate (3x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give 59 mg (65%) of **10a** (BSc4005) as a green oil.

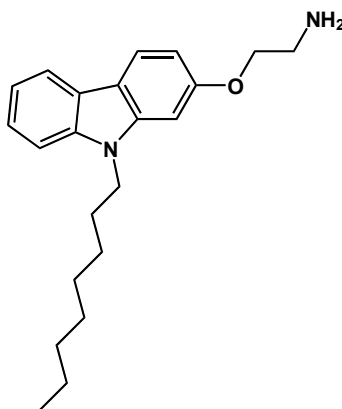
HPLC: 9.22 min (95%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.03-7.96 (m, 2H), 7.45-7.36 (m, 2H), 7.27-7.20 (m, 1H), 6.92-6.85 (m, 2H), 4.41 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.95 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.85 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.29 (m, 10H), 0.90 (t, *J* = 12 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 177.1, 157.8, 141.7, 140.7, 124.5, 123.0, 121.1, 119.6, 118.9, 117.3, 108.5, 107.4, 94.5, 63.7, 43.1, 34.6, 31.8, 29.4, 29.2, 28.3, 27.3, 22.6, 14.1 ppm.

MS (*m/z*, 70 eV, EI) = 367 [M].

2-(9-octyl-9H-carbazol-7-yloxy)ethanamine **10i** (BSc4019)



tert-butyl 2-(9-octyl-9H-carbazol-7-yloxy)ethylcarbamate **31**

According to general procedure **2.1**: **8** (Bsc4029) (0.100 g, 0.33 mmol), Cs₂CO₃ (0.322 g, 0.99 mmol), *tert*-butyl 2-bromoethylcarbamate (0.083 mL, 0.37 mmol), DMF (4 mL).

Yield: 0.103 g (71%), clear oil.

HPLC: 10.5 min (94%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.89-7.86 (m, 1H), 7.98-7.92 (m, 1H), 7.44-7.35 (m, 2H), 7.26-7.17 (m, 1H), 6.84-6.75 (m, 2H), 5.07 (s, 1H, NH), 4.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 5.11 Hz, 2H), 3.64-3.58 (m, 2H), 1.85 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.33-1.20 (m, 10H), 0.90-0.73 (m, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 156.9, 154.9, 140.6, 139.6, 123.4, 121.9, 120.0, 118.4, 117.8, 116.1, 107.4, 106.3, 92.9, 78.5, 66.6, 42.0, 39.3, 30.7, 28.6, 28.1, 27.8, 27.4, 26.3, 21.5, 13.0 ppm.

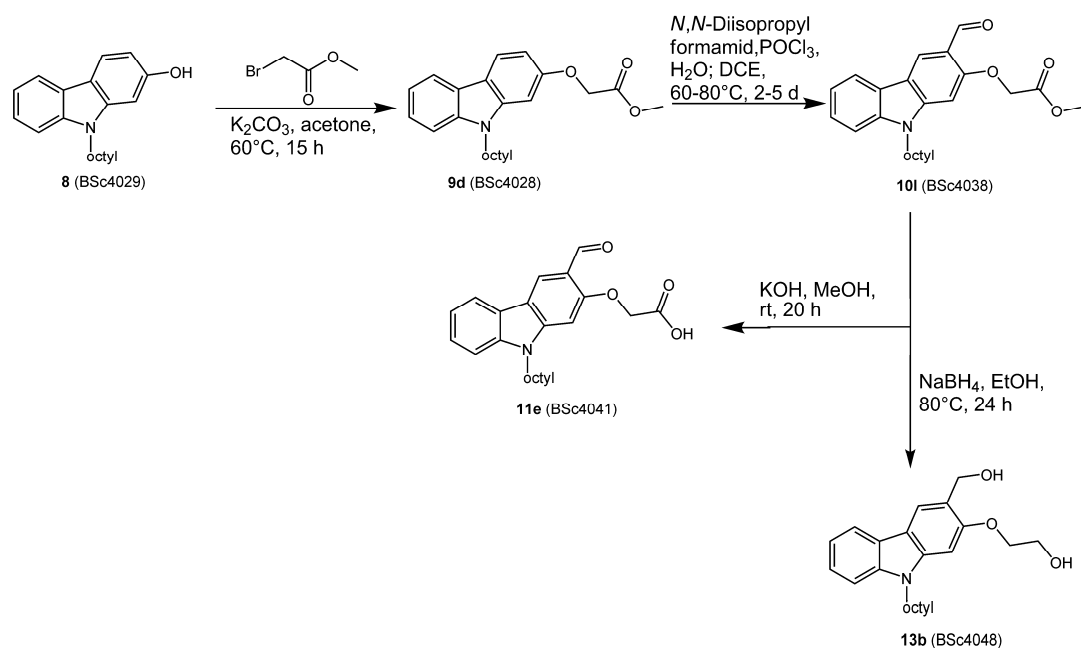
To a solution of *tert*-butyl-2-(9-octyl-9H-carbazol-7-yloxy)ethylcarbamate **31** (0.090 g, 0.20 mmol) in CH₂Cl₂ (5mL) was added under Argon trifluoroacetic acid (0.400 mL,

0.61mmol) and stirred 20h at r.t.. 5ml CH₂Cl₂ were added and the organic layer was sequentially washed with NaHCO₃aq (3x10mL) and brine (3x10ml), dried over Na₂SO₄, concentrated *in vacuo* to give 0.072 g (99%) of **10i** (BSc4019) as pale yellow oil.

HPLC: 6.8 min (93%).

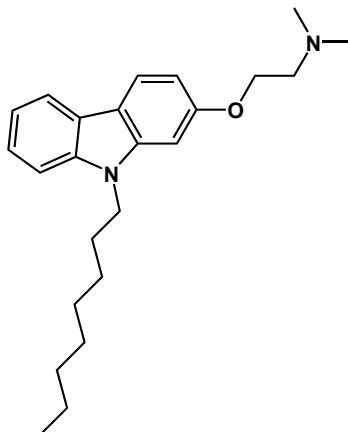
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.42-7.31 (m, 1H), 7.19 (ddd, *J* = 7.8, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.83-6.76 (m, 1H), 4.19-4.14 (m, 4H), 2.52 (s, 2H, NH₂), 1.83 (td, *J* = 14.7, 7.5 Hz, 2H), 1.32-1.19 (m, 10H), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.0, 141.6, 140.6, 124.4, 122.9, 121.0, 119.5, 118.8, 117.1, 108.4, 107.3, 94.1, 69.4, 43.0, 41.3, 31.7, 29.3, 29.1, 28.8, 27.9, 22.5, 14.0 ppm.



Scheme S19: Detailed synthesis of **9d** (BSc4028), **10i** (BSc4038), **11e** (BSc4041), **13b** (BSc4048).

***N,N*-dimethyl-2-(9-octyl-9*H*-carbazol-2-yloxy)ethanamine 11b (BSc4122)**



According to general procedure 2.1: **8** (Bsc4029) (0.050 g, 0.16 mmol), K₂CO₃ (0.066 g, 0.48 mmol), 2-chloro-*N,N*-dimethylethanamine hydrochloride (0.026 g, 0.18 mmol), acetone (5 mL), 16h.

Yield: 0.038 g (64%), yellow oil.

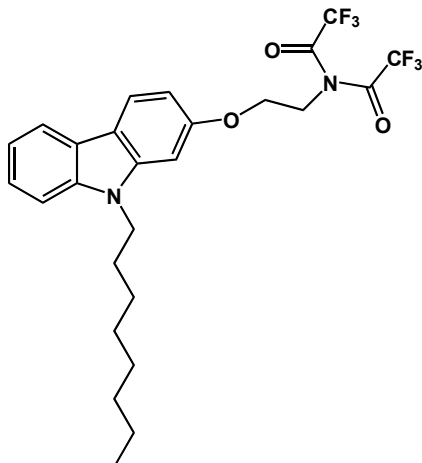
HPLC: 7.3 min (93%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 21.7, 11.4, 4.4 Hz, 2H), 7.24-7.18 (m, 1H), 6.90 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 4.21 (dd, *J* = 9.5, 3.8 Hz, 4H), 2.82 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.40 (s, 6H), 1.89-1.78 (m, 2H), 1.28-1.20 (m, 10H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 158.5, 142.1, 141.0, 124.7, 123.4, 121.3, 119.8, 119.1, 117.3, 108.7, 107.7, 94.7, 66.8, 58.8, 46.3, 43.4, 32.1 29.7, 29.5, 29.2, 27.7, 22.9, 14.4.

MS (*m/z*, 70 eV, EI) = 366 [M]⁺.

2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-(9-octyl-9*H*-carbazol-2-yloxy)ethyl)-*N*-(2,2,2 trifluoroacetyl) acetamide 11d (BSc4123)



To a solution of **10i** (BSc4019) (0.015g, 0.04 mmol) in CH₂Cl₂ (2mL) was added trifluoroacetic anhydride (0.009 g, 0.04 mmol) and stirred 5d at r.t.. 10ml CH₂Cl₂ were added and the organic layer was sequentially washed with 0.1N NaOHaq (3x10mL) and brine (3x10ml), dried over Na₂SO₄, concentrated *in vacuo* to give 0.018 g (94%) of **11d** (BSc4123) as yellow oil.

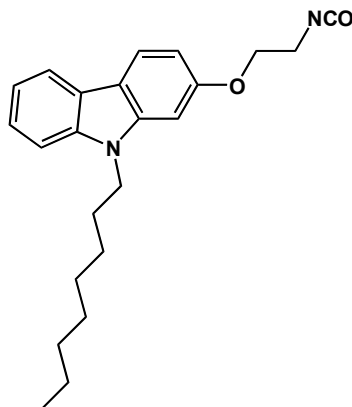
HPLC:10.3 min (90%).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 9.59-9.51 (m, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.46 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.31-7.23 (m, 1H), 4.43 (dd, *J* = 12.2, 6.3 Hz, 4H), 3.71-3.37 (m, 2H), 1.78 (td, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 2H), 1.20 (dd, *J* = 15.3, 8.9 Hz, 10H), 0.81 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 158.0, 145.8, 141.3, 126.3, 125.1, 122.0, 120.7, 120.6, 117.0, 114.1, 110.2, 93.6, 66.4, 42.8, 38.9, 31.5, 29.0, 28.9, 28.6, 26.6, 22.4, 14.2 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 530 [M]⁺.

2-(2-isocyanatoethoxy)-9-octyl-9H-carbazole 11c (BSc4124)



According to general procedure 2.1: **8** (Bsc4029) (0.300 g, 1.01 mmol), Cs₂CO₃ (0.987 g, 3.03 mmol), *tert*-butyl 2-bromoethylcarbamate (0.083 mL, 0.37 mmol), DMF (12 mL) reflux 2d.

Yield: 0.103 g (22%), clear oil.

HPLC: 12.2 min (94%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.02 Hz, 1H), 7.26-7.20 (m, 1H), 6.84 (d, J = 2.03 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 5.26 (s, 1H, NH), 4.18-4.11 (m, 4H), 3.70 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 1.85-1.76 (m 2H), 1.28-1.13 (m, 10H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 158.4, 157.9, 141.6, 140.6, 124.4, 122.8, 121.0, 119.5, 118.9, 117.1, 108.4, 107.4, 93.9, 68.2, 42.9, 40.3, 31.8, 29.3, 28.7, 27.2, 22.6, 14.0 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 364[M]⁺.

4.4 Histologie: Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Gewebeproben werden in 10% Formalinlösung fixiert, in Paraffin eingebettet, am Mikrotom auf 4 µm geschnitten und im Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Die Entparaffinierung für die Immunhistologie erfolgt automatisiert im Ventana Nexes (Ventana, Tuscon, AZ) zusammen mit der anschließenden immunhistologischen Präparation. Es wurde der Amyloid Antibody A (clon mc1, DAKO, Glostrup, Denmark) und ein avidin-peroxidase Kit (Ventana, Tucson, AZ) verwendet. Die Entparaffinierung für die konventionellen Färbungen wird nach folgender Routine durchgeführt: 15 min Xylol, 10 min Ethanol (100%), 10 min Ethanol (96%) und 10 min Ethanol (70%) Tauchbad. Die Gewebeschnitte werden anschließend bis zur Weiterverarbeitung in Wasser gelagert. Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgt mit den in Kapitel 4.1 genannten Mikroskopen.

4.4.1 Standard Färbeprotokoll für die Gewebeschnitte mit Farbstoffen

Arbeits-schritte	Reagenz/Solvens	Zeit	Bemerkungen
1.	Saures Hämalaun	10 min	Zellkernfärbung
2.	Leitungswasser bläuen	5 min	
3.	Färbelösung	5-10 min	Siehe Erläuterungen
4.	Ethanol/Methanol spülen		3-6 mL, bei Bedarf mit 1-10% DMSO
5.	Leitungswasser spülen	3-5 min	
6.	1 % Essigsäure	15 min	Differenzieren
7.	Leitungswasser spülen	5 min	
8	Eindecken		Mit Roti®-Mount FluorCare oder Glycerin-Puffer-Gemisch

Erläuterungen zu Arbeitsschritt 3:

Für Thioflavin werden die Gewebeschnitte in wässrige 1% Thioflavinlösung eingelegt.

Für die anderen Farbstoffe werden als 0,01-1% ethanolische oder methanolische Lösung auf den Gewebeschnitt aufgetropft (50-200 µL) und in einer feuchten (EtOH/MeOH) lichtgeschützten

Kammer inkubiert. Bei schwer löslichen Substanzen wird bis zu 10% DMSO zugegeben und gegebenenfalls durch einen Spritzenfilter (0,45 μm Porengröße) filtriert.

Optimiertes Tauchbad-Verfahren zu Arbeitsschritt 3:

Ein 10 Positionen umfassender Alubeckenblock ($V_{\text{max}} = 2 \text{ mL}$) wird für die Tauchbadfärbung mit 1 ml MeOH je Becken aufgefüllt. Die Objektträger werden mit den Schnitten eingelegt und die 0,01-1% methanolische Färbelösung (1 mL) frisch filtriert (Spritzenfilter, 0,45 μm Porengröße) zugegeben und 10 min unter Lichtausschluss inkubiert.

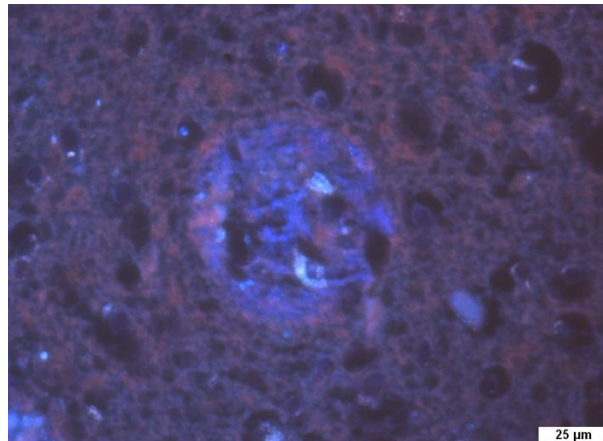
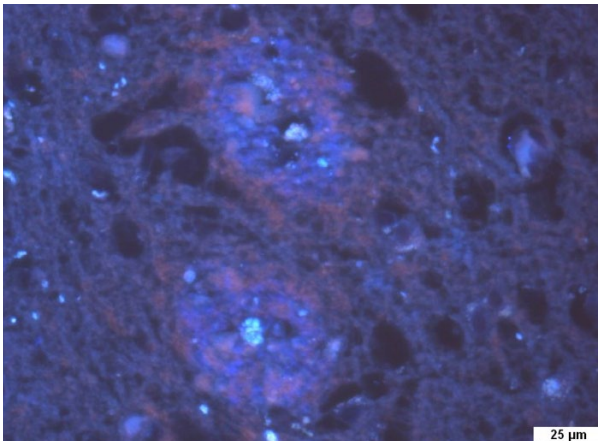
4.4.2 Die histologischen Ergebnisse im Überblick

Die jeweilig untersuchte Gewebeart, Alter und Geschlecht des Patienten sind den Bilder nachgestellt. Das standardmäßig verwendete Hirngewebe für die Alzheimer Demenz Färbung stammt aus dem Ammonshorn (AH; Hippocampus). Die andere untersuchten Gewebearten sind jeweils erläutert und stammten aus der Riechschleimhaut, dem Darm und dem Mittelhirn. Aus den gemachten Aufnahmen werden jeweils nur repräsentative Bilder der durchgeführten Färbung abgebildet, die für die beobachteten Eigenschaften und Färbeergebnisse charakteristisch sind. Die Ziffer in Eckigen Klammern am Ende einer Dokumentation steht für die Summe aller Bilder („[B:]“) des jeweiligen Farbstoffes.

4.4.2.1 Histologie diverser kommerzieller Farbstoffe

Die im folgenden untersuchten Farbstoffe sind kommerziell erhältlich und Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit bekannten affinen Strukturmotiven ausgewählt worden.

Histologie von BSc4089

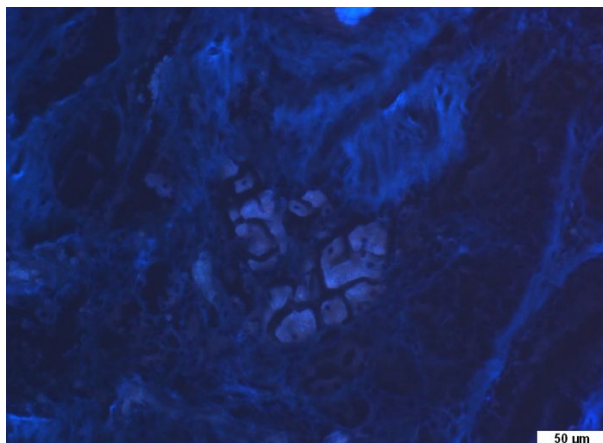
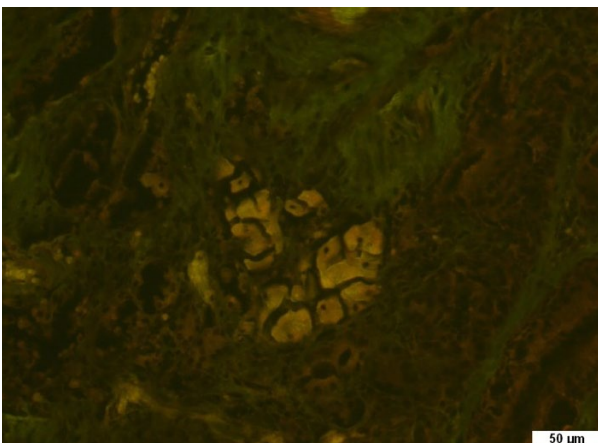
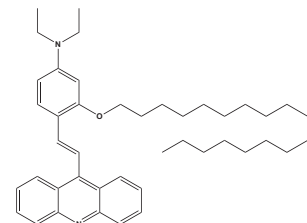


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

Aβ-Plaques: positiv, schwache Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: keine Färbung

Bemerkungen: Farbeindruck: blau für die spezifischen Ablagerungen (Aβ-Plaques) und rot für den Hintergrund [B: 3]

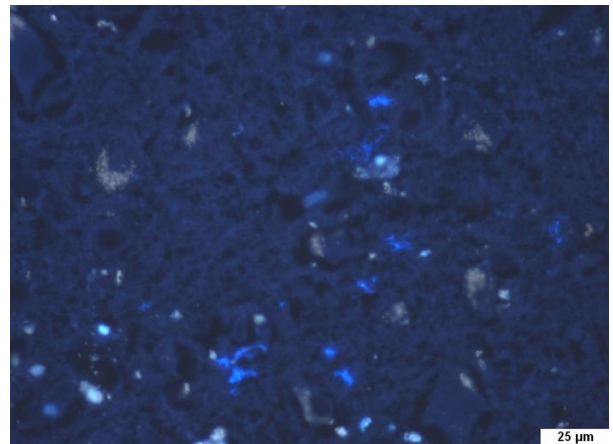
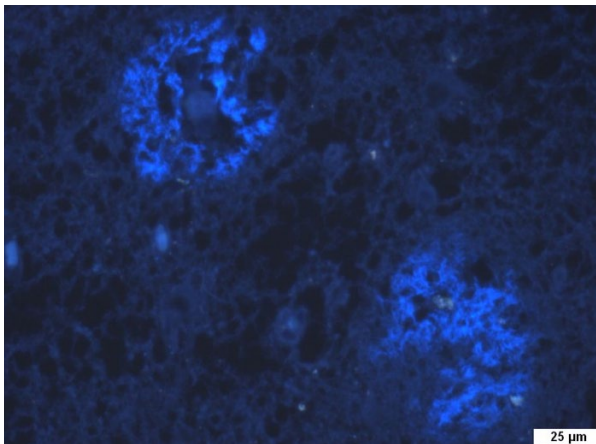


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, andere Farbe als der Hintergrund aber mäßige Fluoreszenz

Bemerkungen: FITC Filter, Fluoreszenz *on target* blau, Material auf der Oberfläche ausgefallen orange Fluoreszenz [B: 5]

Histologie von BSc4091



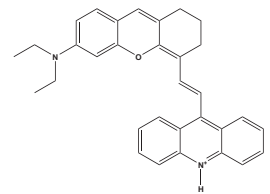
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: das Zentrum der Plaque ist nicht gefärbt.

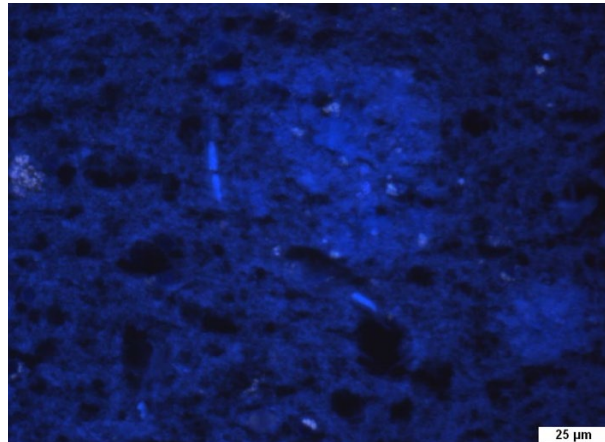
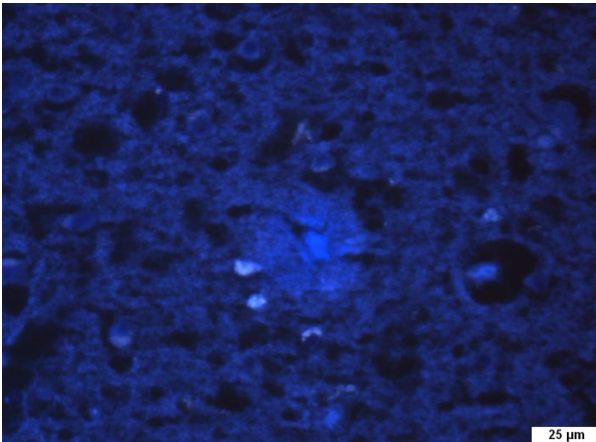
Guter Kontrast in der Übersicht. Nur der Hintergrund bleicht schnell aus.

Tau-Fibrillen: keine Färbung

Bemerkungen: Gewebe ist stark Tau belastet, eventuell frühe Tangles zu sehen aber nicht klar zu identifizierenden [B: 4]



Histologie von BSc4093

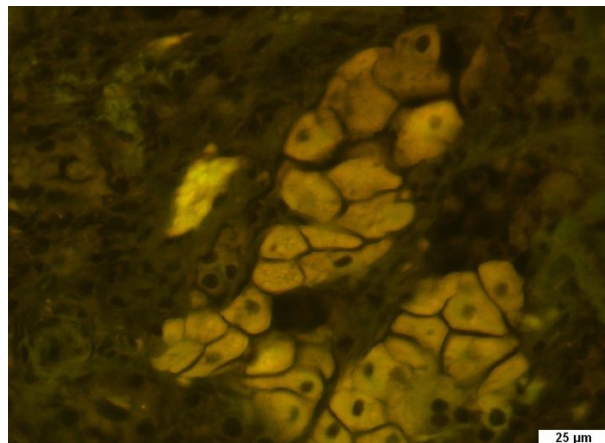
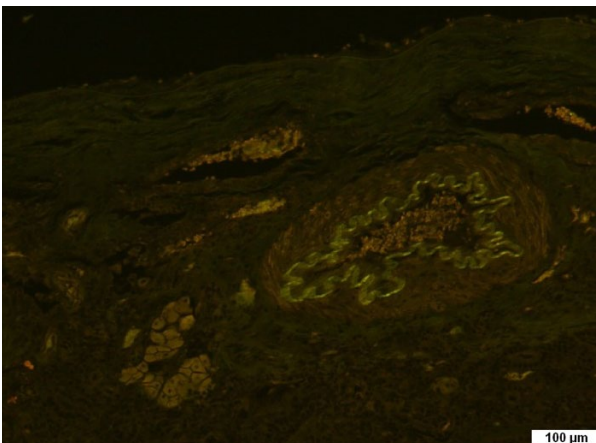
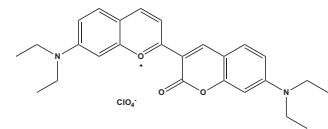


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: positiv, aber sehr schwache Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ keine Färbung

Bemerkungen: Gewebe ist stark Tau belastet, schlechter Kontrast, diffuse Plaque (rechtes Bild) [B: 4]



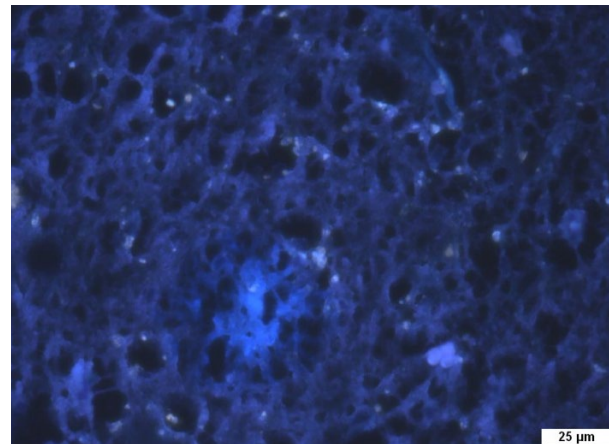
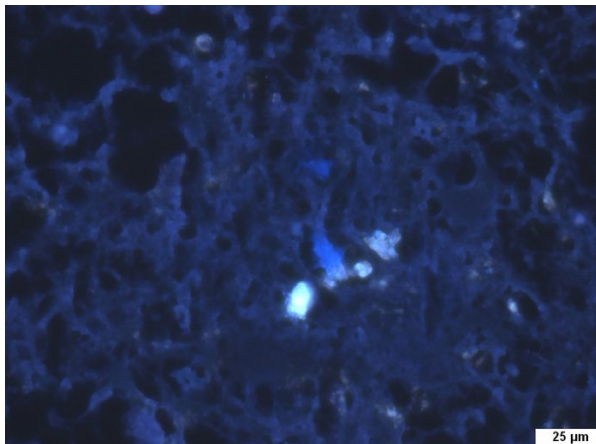
Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, gute Übersicht/Kontrast; Fluoreszenz besser als auf dem AH

Bemerkungen: Aufliegende Kristalle, Blutgefäße gefärbt,

FITC-Filter Farbeindruck: orange [B: 7]

Histologie von BSc4092

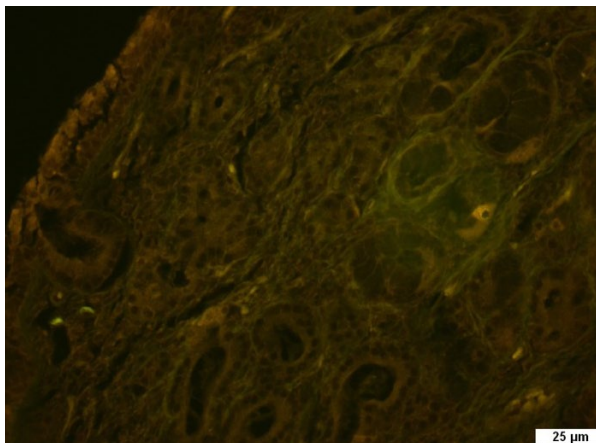
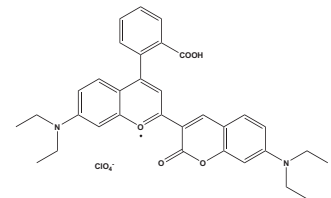


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: sehr schwache Plaque Färbung

Tau-Fibrillen: keine Färbung.

Bemerkungen: Gewebe ist sehr stark verdaut,
Gewebe ist stark Tau belastet. [B: 2]

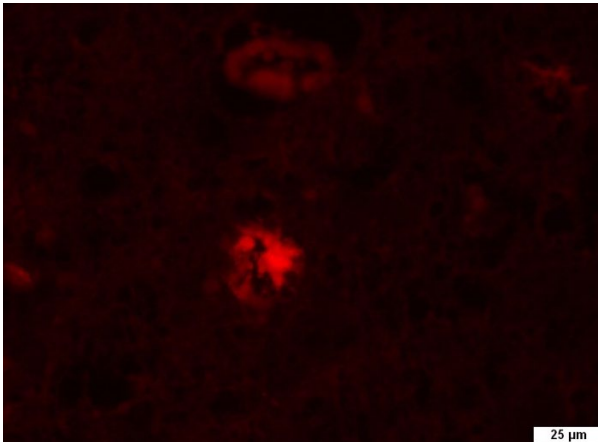


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: eventuell positiv

Bemerkungen: diffuse sehr schwache Färbung der Drüsen,
eventuell ist der Farbstoff nicht ins Gewebe eingedrungen [B: 3]

Histologie von BSc4094



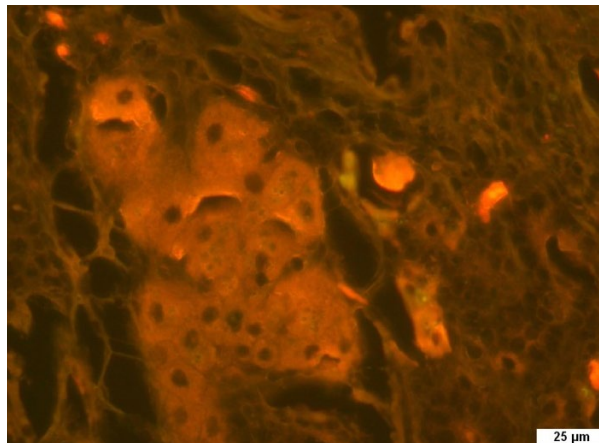
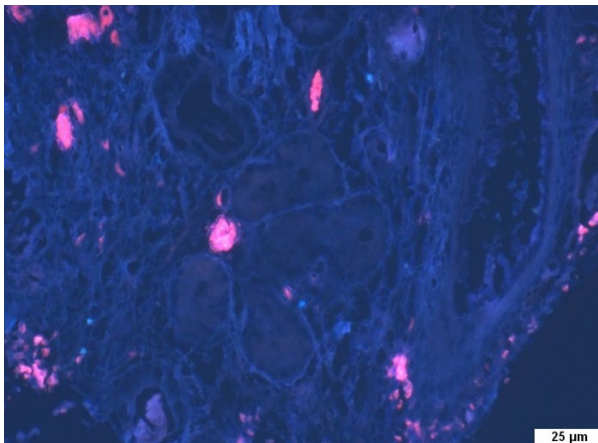
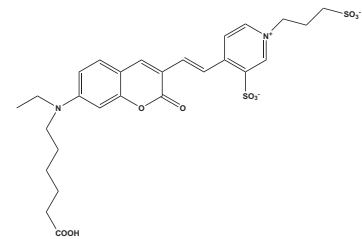
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: Eine Plaque zu sehen. Farbe geht in den roten Bereich (Auraminfilter (546/890 nm))

Sehr dunkel, schlechter Kontrast.

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: Gewebe ist stark Tau belastet [B: 1]

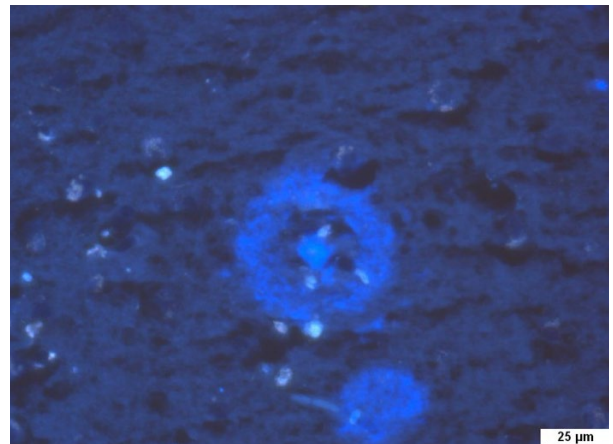
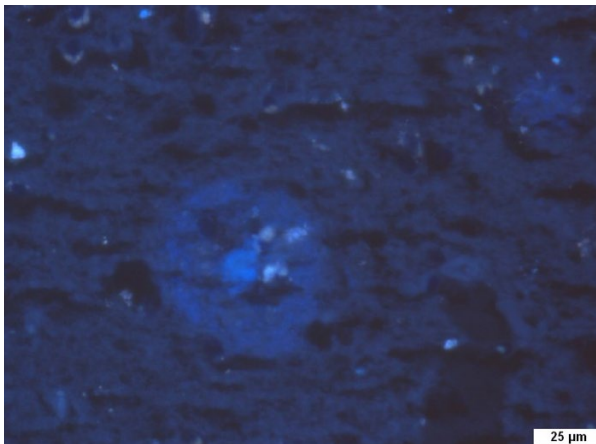


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: schwach positiv (rechtes Bild)

Bemerkungen: Erythrozyten stark positiv (linkes Bild) [B: 7]

Histologie von BSc4095

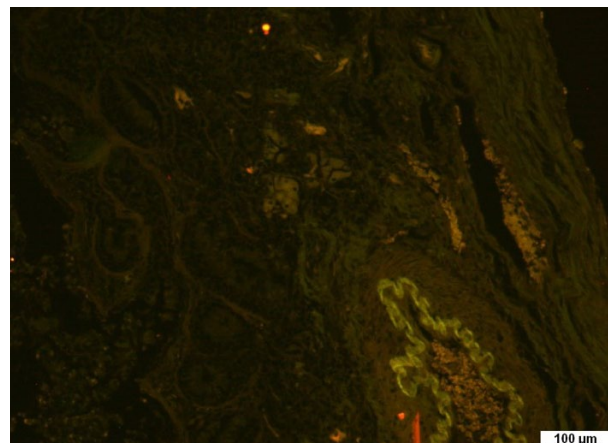
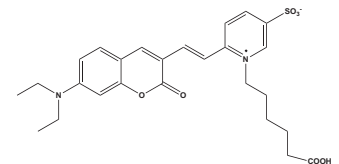


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: positiv, nur zentrale und Außenbereiche der Plaque sind gefärbt, schwache Fluoreszenz; *Fleecy* Amyloid gefärbt

Tau-Fibrillen: negativ keine Färbung

Bemerkungen: rechtes Bild elektronisch aufgehellt, links original Kontrast Eindruck [B: 5]

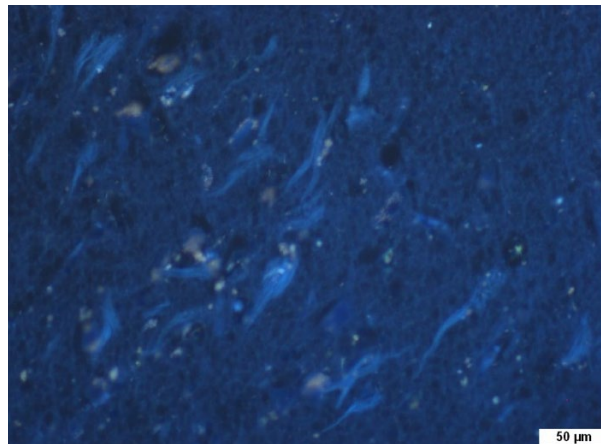
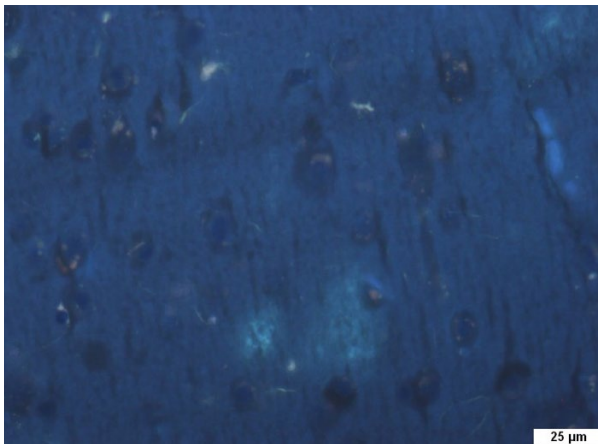


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, schwache Fluoreszenz aber besser als im AH

Bemerkungen: elastischen Fasern der Gefäßwand ebenfalls schwach im Kontrast und Fluoreszenz, nicht betroffene Drüsen ebenfalls zu sehen [B: 8]

Histologie von BSc4560



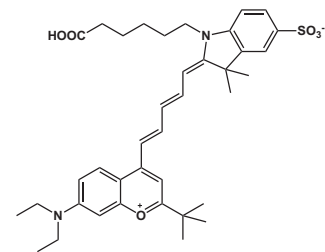
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

Aβ-Plaques: negativ, keine Färbung scheint nicht zu Binden

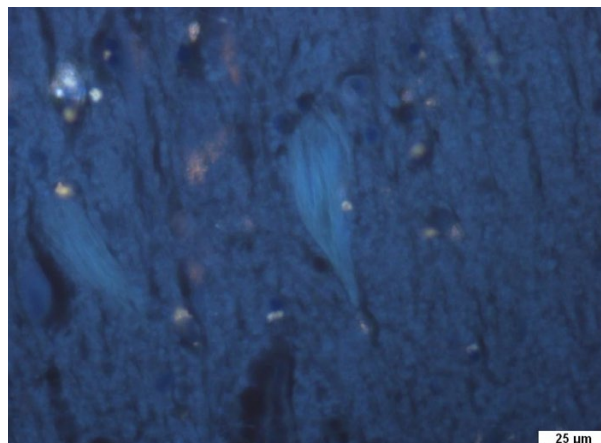
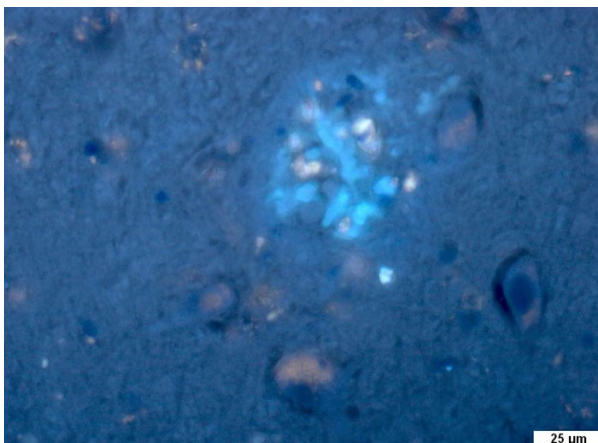
Tau-Fibrillen: positiv; Kontrast und Intensität o.k.

Bemerkungen: nur im DAPI Filter gut zu sehen; Färbt auch die Astrozytenfortsätze; bei den Plaques eventuell

Galenik Problem [B: 3]



Histologie von BSc4561

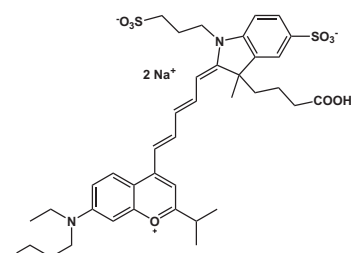


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

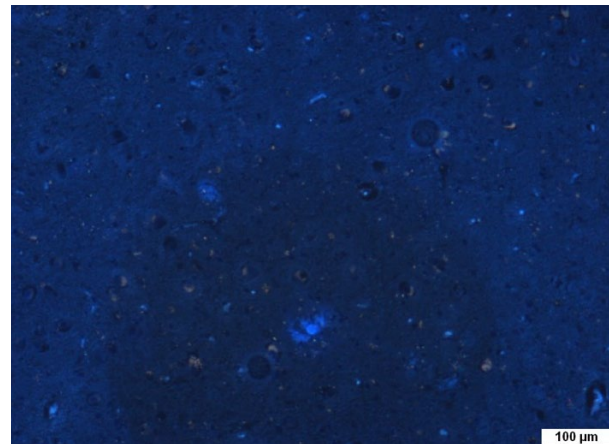
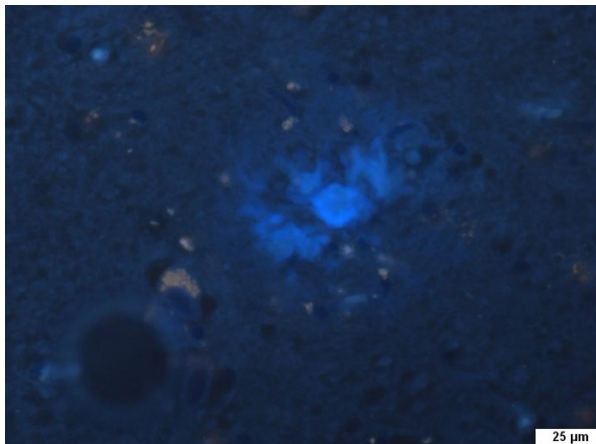
Aβ-Plaques: teilweise positiv; schwache Fluoreszenz/Intensität

Tau-Fibrillen: negativ keine Färbung

Bemerkungen: gewisse Selektivität in der Färbung, da nur Teile der Plaque (eventuell Tau) gefärbt sind [B: 4]



Histologie von BSc4562

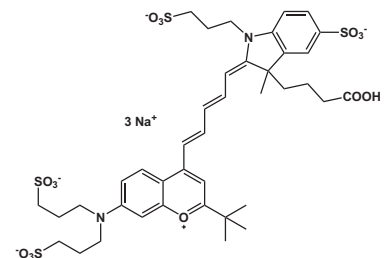


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

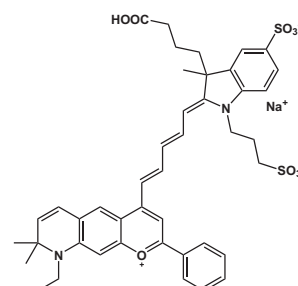
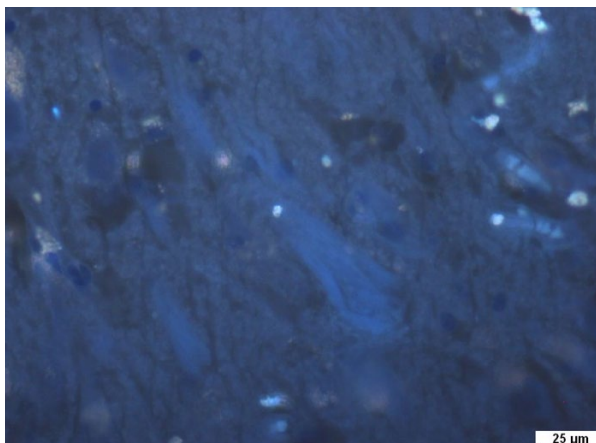
Aβ-Plaques: positiv; gewisse Selektivität in der Färbung, da nur Teile der Plaque gefärbt sind; schwache Fluoreszenz/Intensität

Tau-Fibrillen: negativ keine Färbung

Bemerkungen: Hintergrund bleicht stark aus, Fluoreszenz *on target* bleibt erhalten aber generell schwache Färbung (siehe linkes Bild Bleichkreis) [B: 2]



Histologie von BSc4563



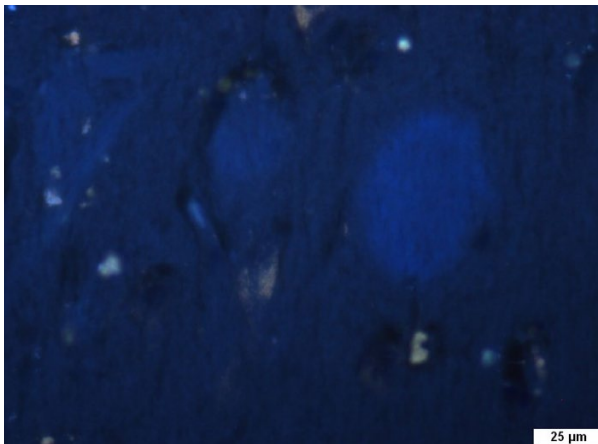
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

Aβ-Plaques: negativ

Tau-Fibrillen: positiv, schwache Fluoreszenz

Bemerkungen: Alles Fotobleicht schnell aus [B: 1]

Histologie von BSc4564

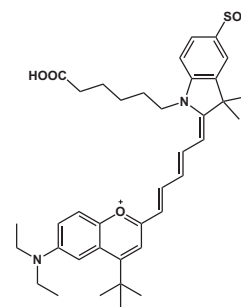


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

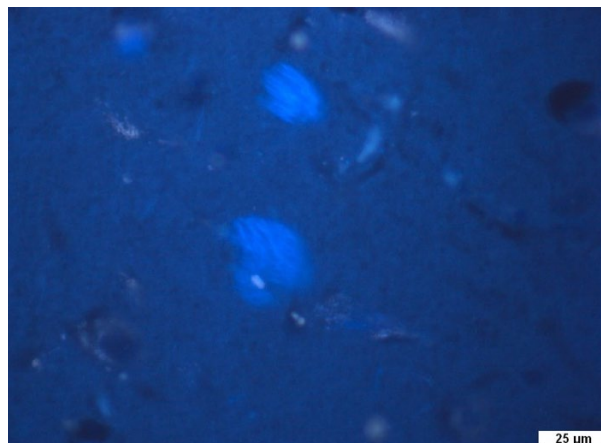
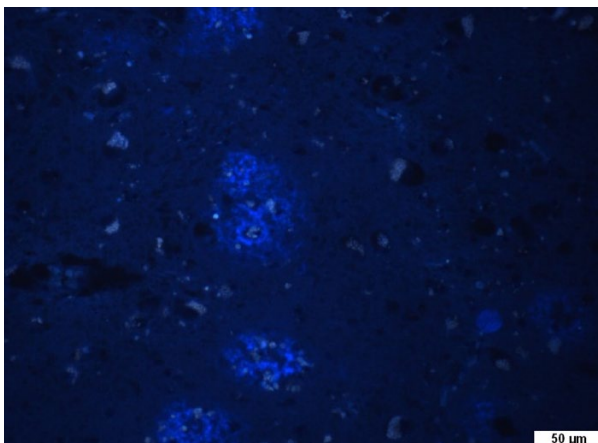
Aβ-Plaques: positiv, sehr schwache Färbung

Tau-Fibrillen: positiv, sehr schwache Färbung

Bemerkungen: schwache Fluoreszenz *on target* [B: 1]



Histologie von BSc4442

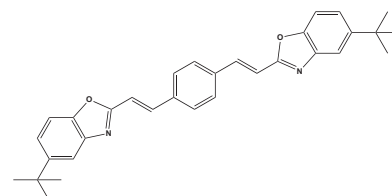


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

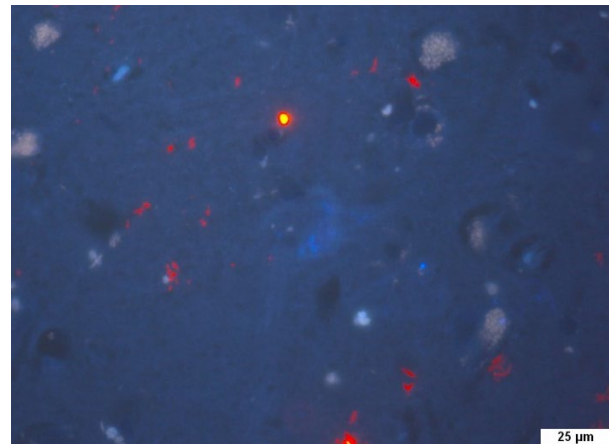
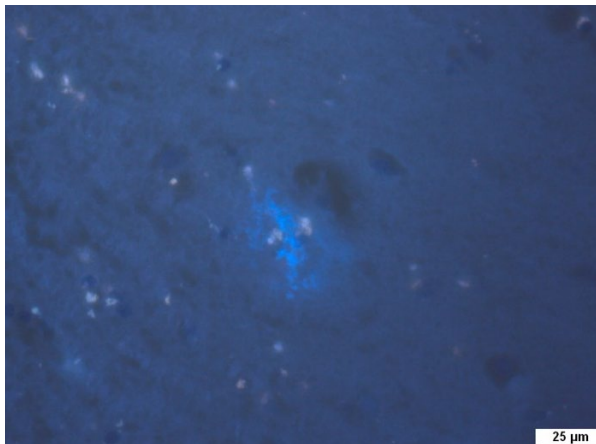
Aβ-Plaques: positiv, sehr guter Kontrast/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr guter Kontrast

Bemerkungen: DAPI-Filter, zusätzlich 100 µL DMSO in der Färbelösung [B: 5]



Histologie von BSc4446

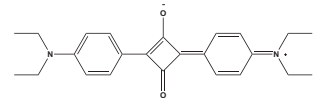


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

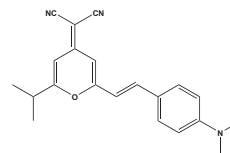
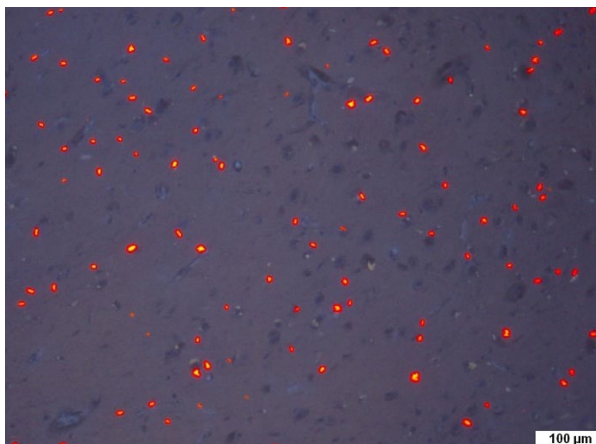
A β -Plaques: positiv, mäßige Fluoreszenz; Farbeindruck: türkis

Tau-Fibrillen: positiv, schwächere Fluoreszenz als auf A β

Bemerkungen: Material teilweise auf der Oberfläche ausgefallen als rot fluoreszierende Kristalle [B: 4]



Histologie von BSc4444

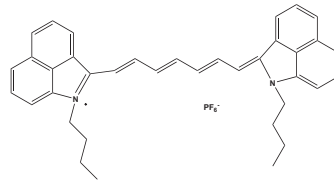
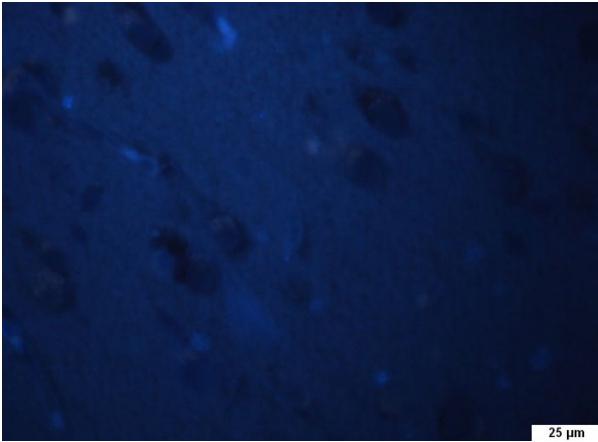


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

A β -Plaques: negativ, keine Anfärbung erfolgt

Tau-Fibrillen: negativ, keine Anfärbung erfolgt

Bemerkungen: Alle-Filter getestet; viel Material auf der Oberfläche ausgefallen (Löslichkeit/Galenik schlecht) [B: 1]



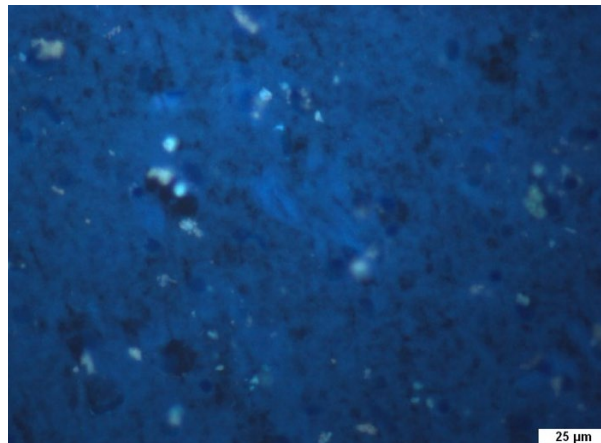
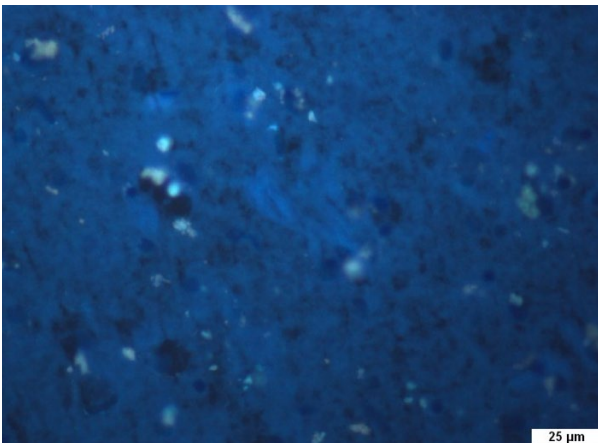
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

Aβ-Plaques: negativ, keine Färbung

Tau-Fibrillen: negativ

Bemerkungen: Alle-Filter getestet [B: 1]

Histologie von BSc4447

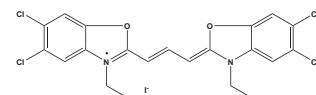


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

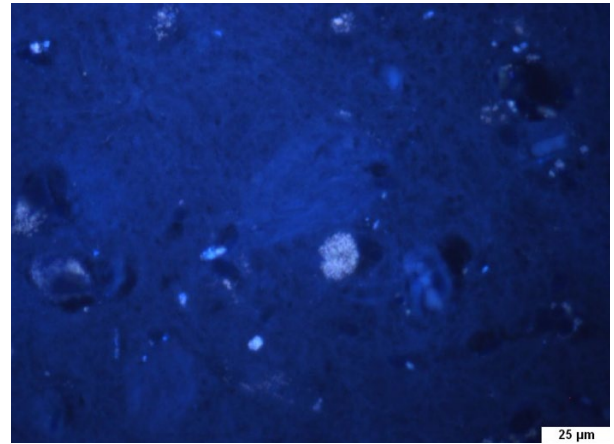
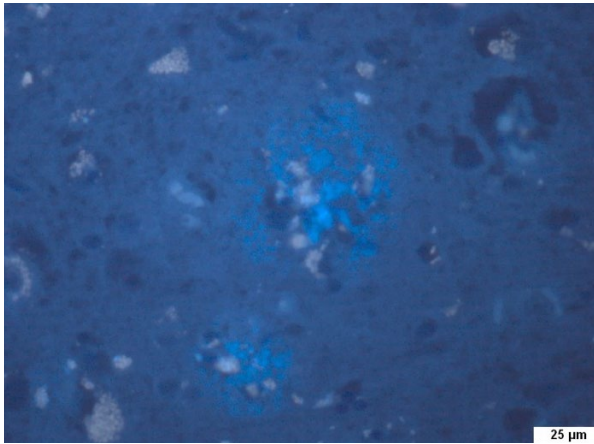
Aβ-Plaques: positiv, sehr schwache Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: [B: 2]



Histologie von BSc4445

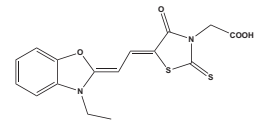


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

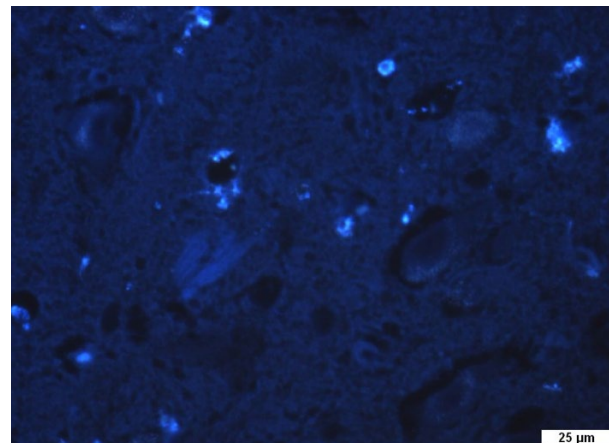
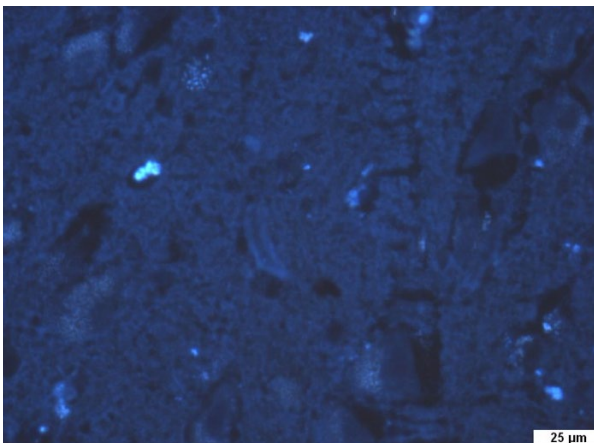
Aβ-Plaques: positiv, schwache bis mittlere Fluoreszenz,
Farbeindruck türkis

Tau-Fibrillen: negativ, nicht angefärbt

Bemerkungen: in der Übersicht sind die Plaque dennoch klar vom
Hintergrund differenziert [B: 2]



Histologie von Isoquercetin

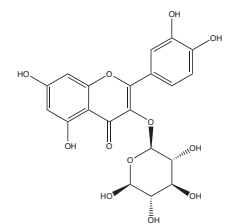


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

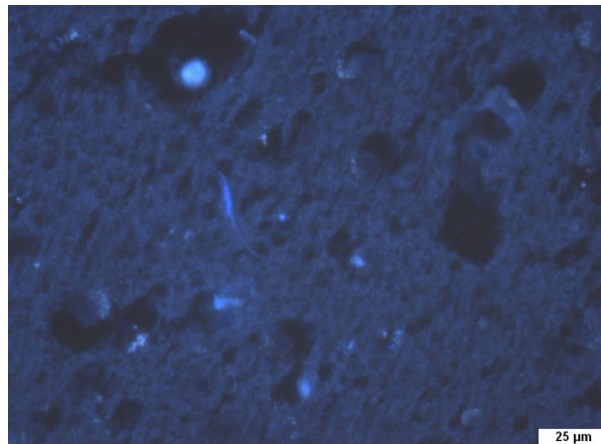
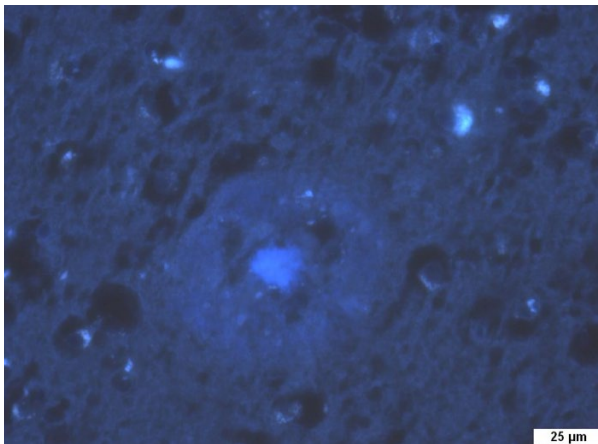
Aβ-Plaques: negativ keine Färbung (siehe linkes Bild)

Tau-Fibrillen: positiv, schwache Fluoreszenz

Bemerkungen: [B: 3]



Histologie von Troxerutin

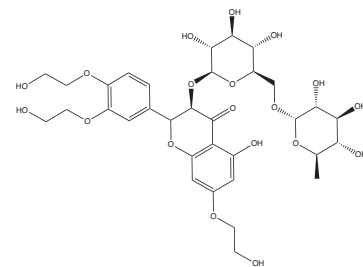


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

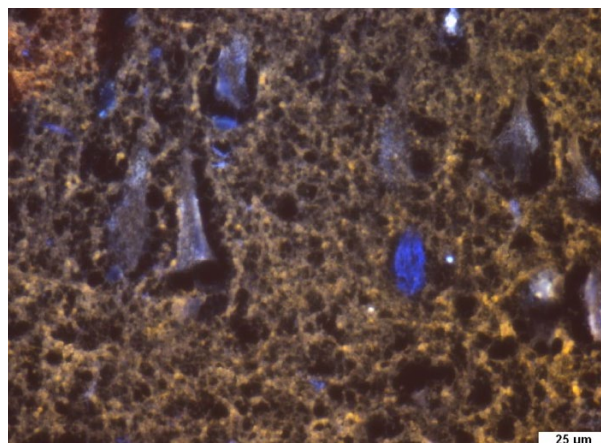
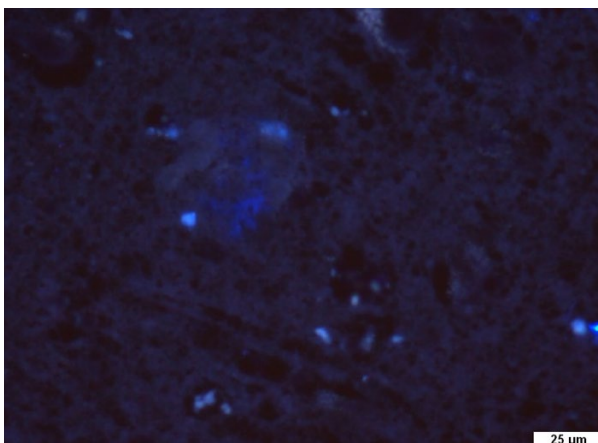
Aβ-Plaques: sehr schwache Färbung, klassischer kernhaltiger Plaque gefärbt

Tau-Fibrillen: nur eine positive Fibrille gefärbt

Bemerkungen: Färbung der diffusen Plaques besser als die Färbung im Neuron, (eventuelle Tau affinität, konnte nicht spezifiziert werden), Galenik Probleme? [B: 7]



Histologie von Rhodamin B

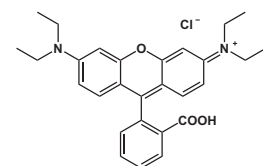


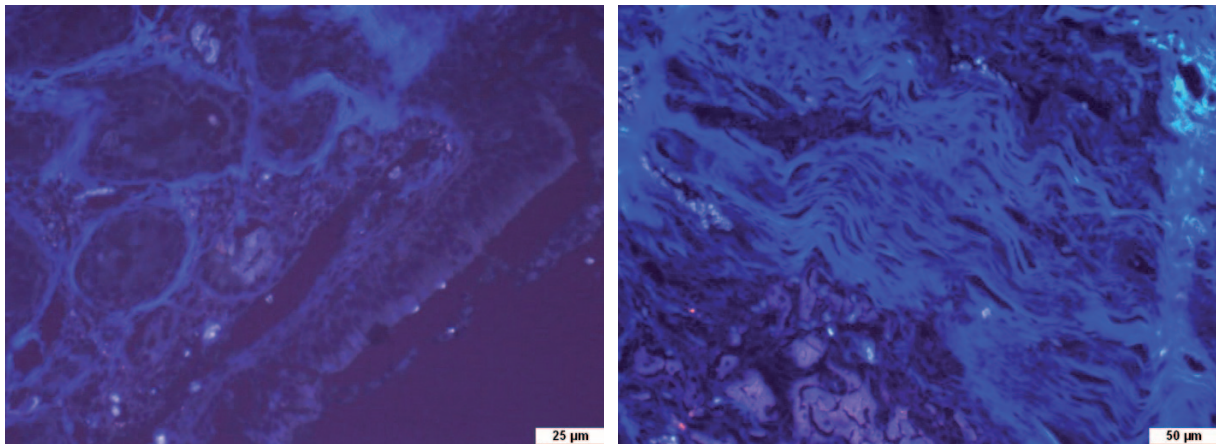
Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Aβ-Plaques: positiv, selektiv, aber relativ schwache Färbung (in MeOH)

Tau-Fibrillen: gute Färbung (wässrig, pH = 10, linkes Bild)

Bemerkungen: Färbung ist sehr pH sensitiv, gute Ergebnisse bei neutralem oder basischem pH-Wert [B: 16]



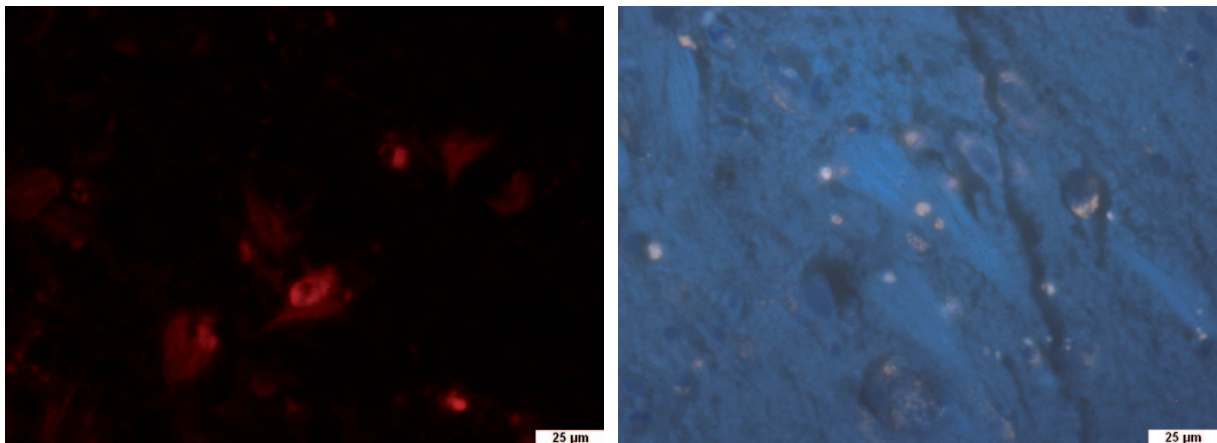


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Baumannndrüsen: positiv, (rechtes Bild, unterer Bildrand)

Bemerkungen: viel unspezifische Färbungen in Bindegewebe und Nerven; generell schwache Fluoreszenz [B: 13]

Histologie von BSc4096



Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

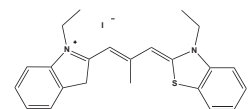
Aβ-Plaques: negativ, keine gefärbten

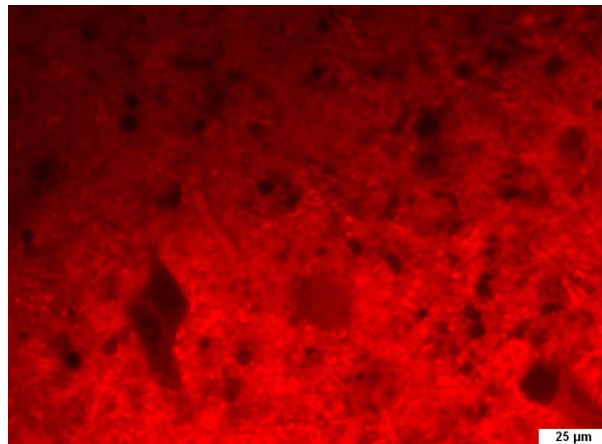
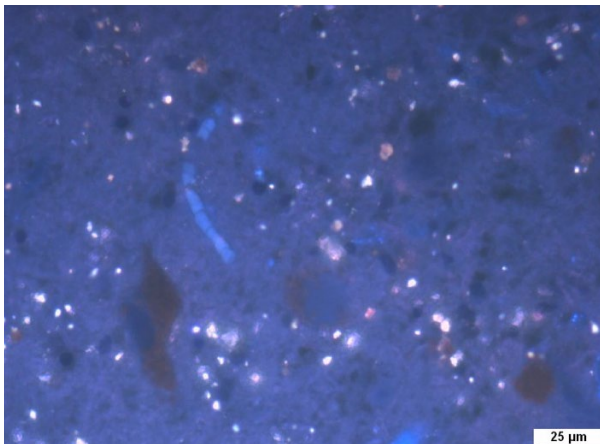
Tau-Fibrillen: positiv, sehr schlechter Kontrast/Fluoreszenz

Bemerkungen: Viel Material an der Oberfläche ausgefallen,

Blasenbildung bei der Mikroskopie Focusierungsprobleme, starkes Fotobleaching $\Delta t < 1$ min;

vgl. zu MeXO 4 sehr schwacher Farbstoff, Gewebe hat ausgeprägte Tau Pathologie. [B: 6]

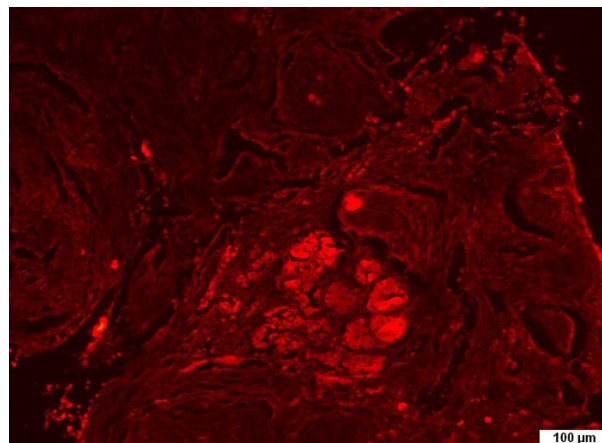
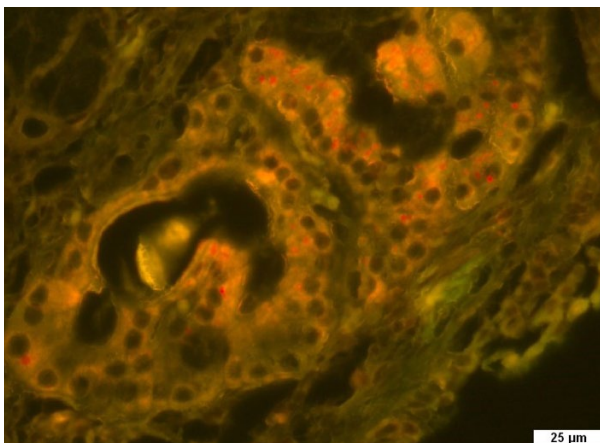




Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: FITC, Auramin-Filter, nur unspezifische Färbung andere Gewebebestandteile [B: 3]



Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, sehr gute Übersicht/Kontrast

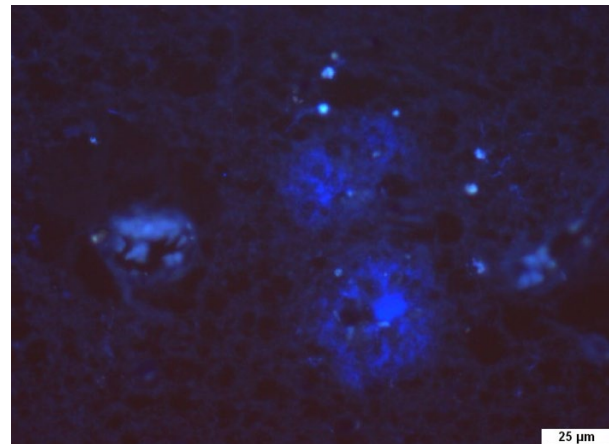
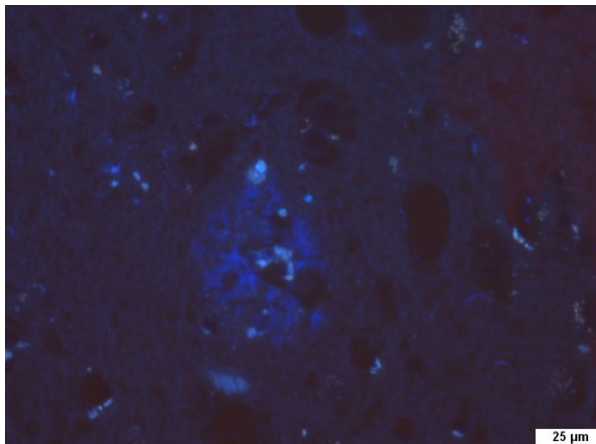
Bemerkungen: FITC/Kombi Rotfilter Filter sichtbar

Hintergrund bleicht aus Fluoreszenz *on target* bleibt

Gewebe stark verdaut; Hämoglobin ebenfalls gefärbt;

Material auf der Oberfläche ausgefallen. [B: 18]

Histologie von Orange 2

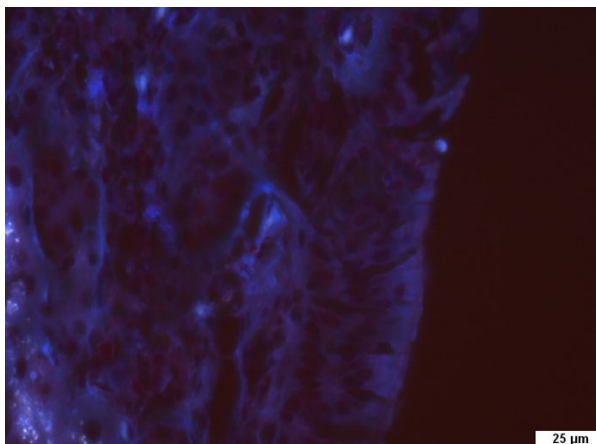
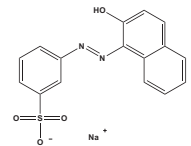


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Aβ-Plaques: positiv, selektive Färbung; guter Kontrast

Tau-Fibrillen: keine Färbung

Bemerkungen: vergleichbar Thioflavin [B: 4]

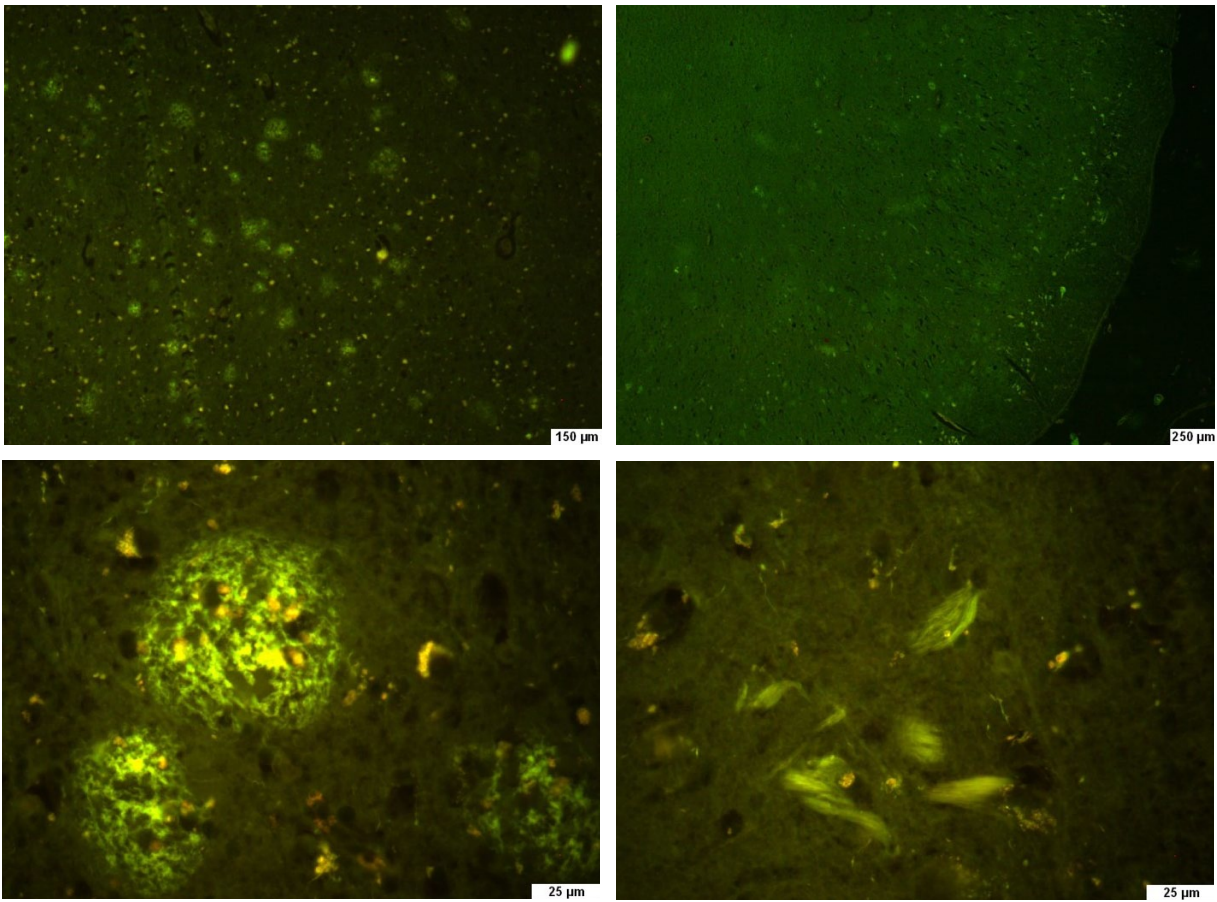


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Baumannndrüsen: negativ

Bemerkungen: unklare Färbung im Epithel, unklare Areale im Nerv [B: 3]

Histologie von Thioflavin Benchmark Verbindung

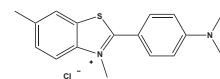


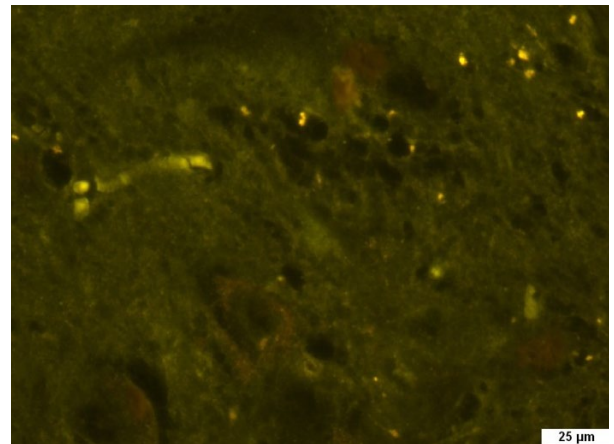
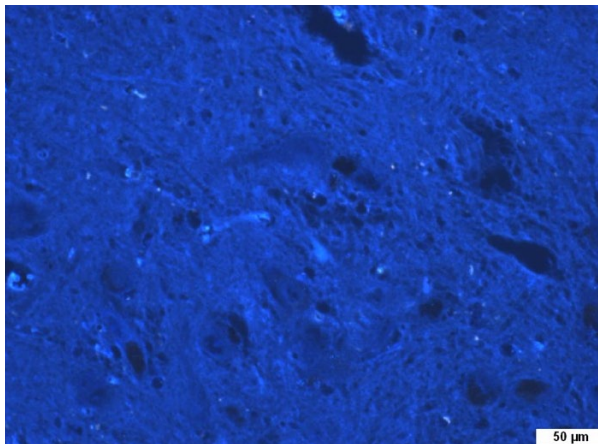
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89/69

Aβ-Plaques: sehr gute Übersicht; guter Kontrast

Tau-Fibrillen: sehr gute Übersicht; guter Kontrast

Bemerkungen: Referenzfarbstoff in der Pathologie [B: 11+3]

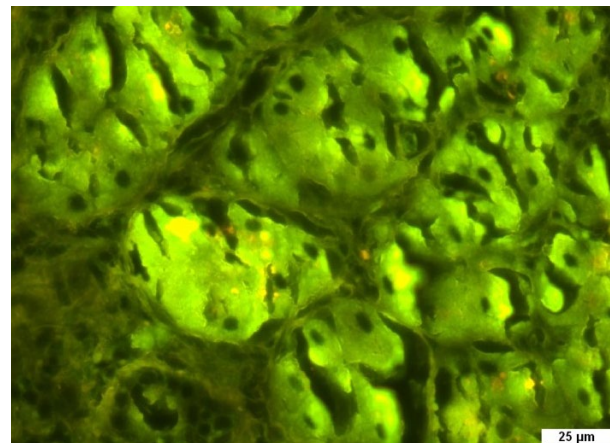
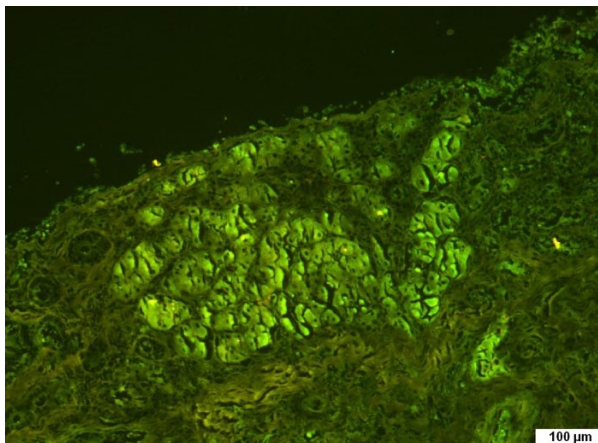




Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

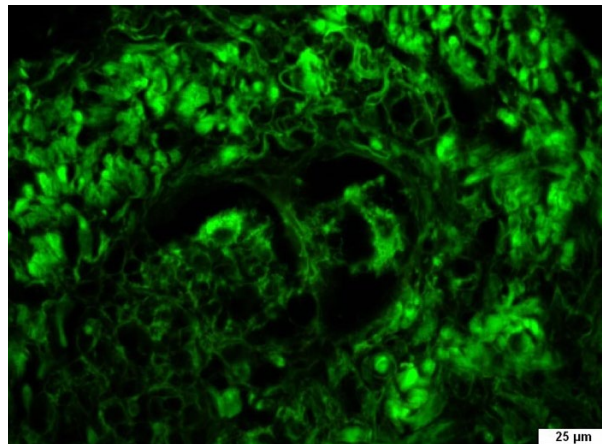
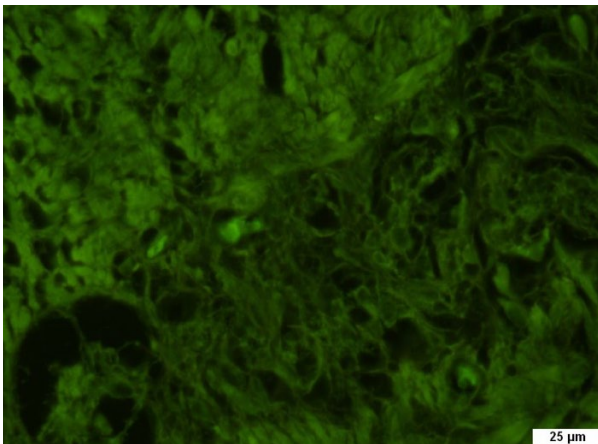
Bemerkungen: DAPI-, FITC-Filter, keinerlei spezifische Färbung [B: 7]



Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmann Drüsen: positiv

Bemerkungen: Thioflavin-Färbung, DAPI-Filter [B: 3]

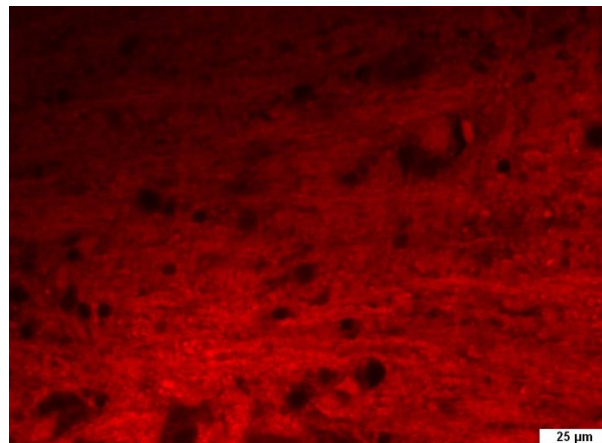
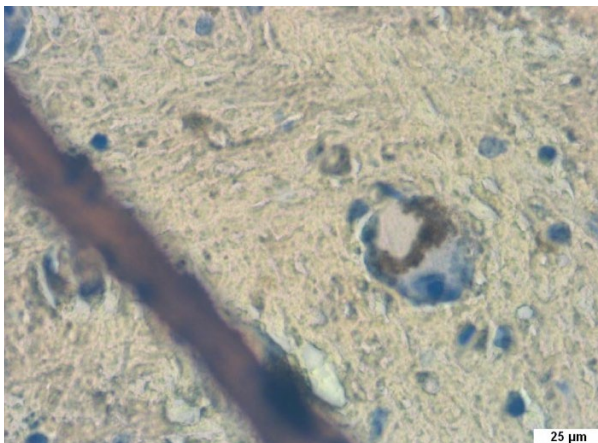


Gewebeart: Darmwand | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

Tau-Ablagerungen: negativ

Bemerkungen: nur unspezifische Färbungen [B: 13]

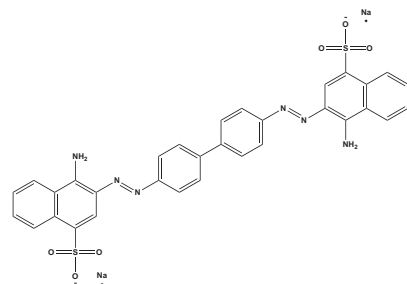
Histologie von Kongorot Benchmark Verbindung



Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

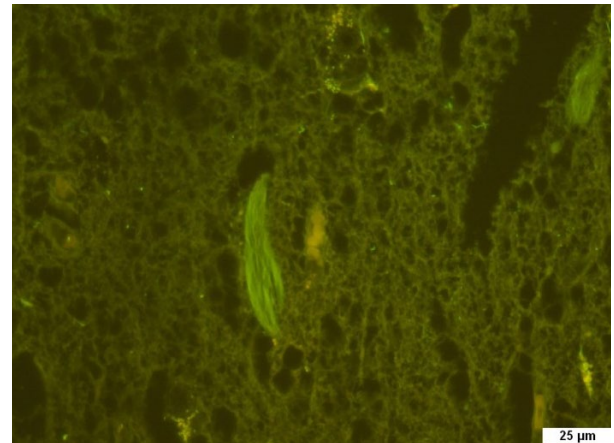
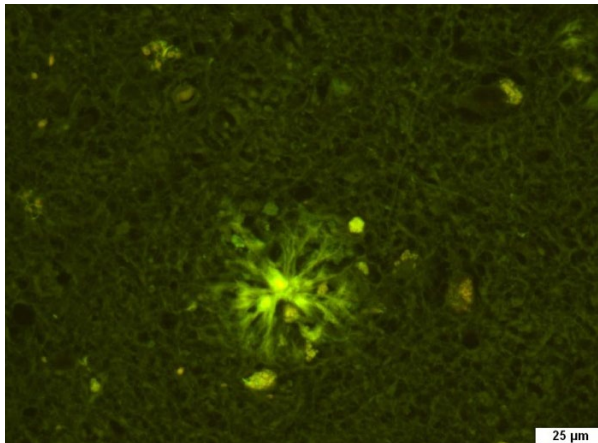
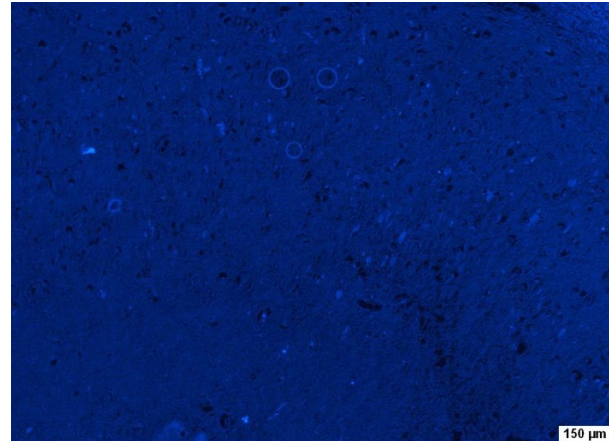
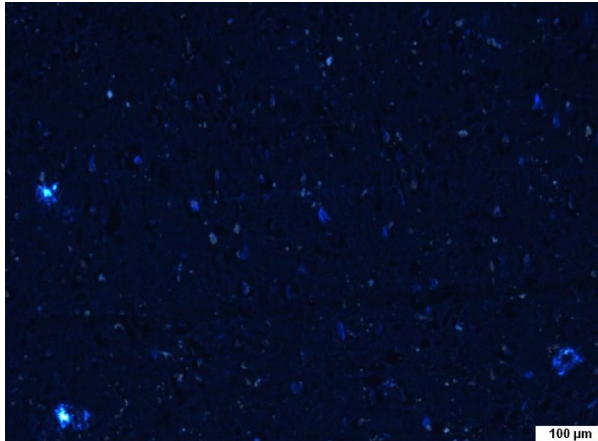
a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: linkes Bild Durchlicht, rechtes Bild Auramin Filter [B: 2]



4.4.2.2 Histologie diverser synthetisierter Farbstoffe

Histologie von Methoxy-XO4, BSc3924



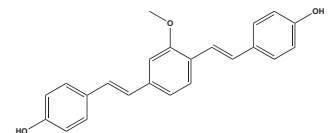
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 59

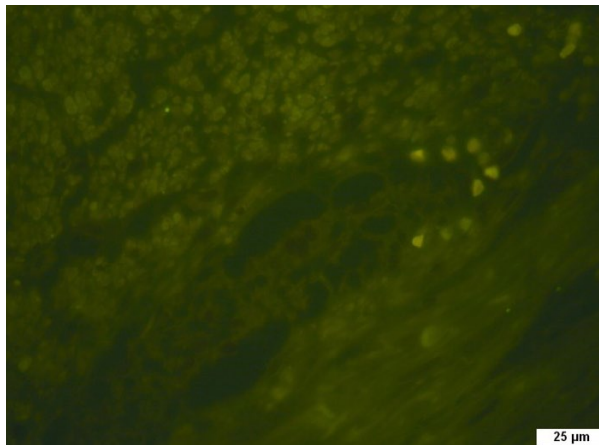
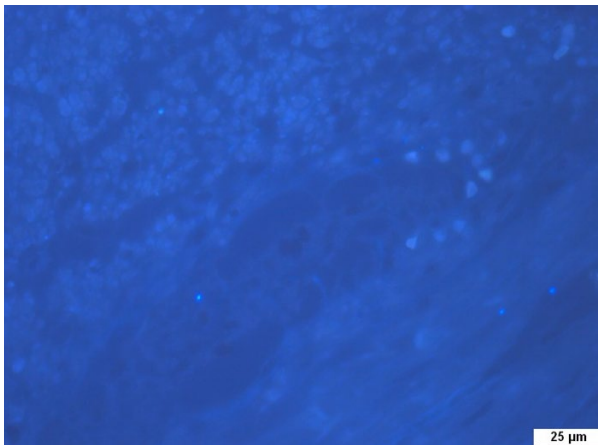
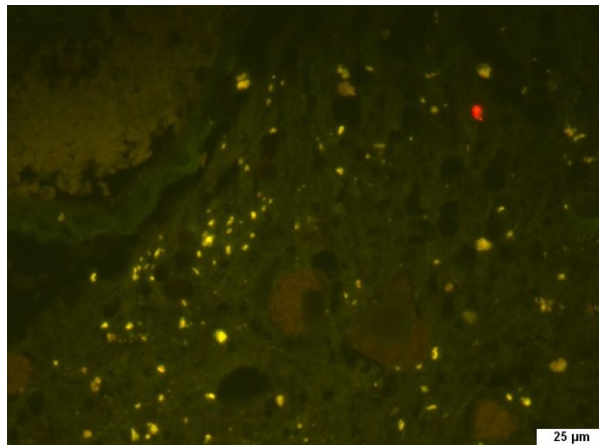
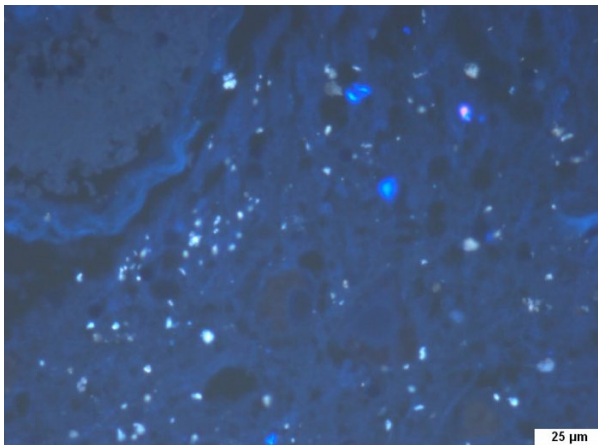
Aβ-Plaques: sehr gute Färbung, guter Kontrast

Tau-Fibrillen: sehr gute Färbung, guter Kontrast

Bemerkungen: gute Fluoreszenz, Referenzfarbstoff in Tierexperimenten

Trisomie 21 Patient [B: 25]



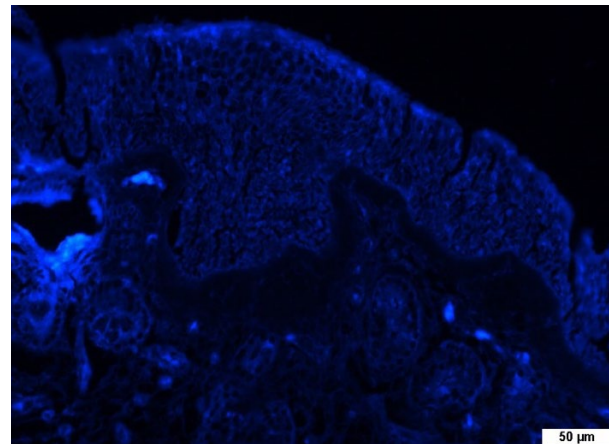
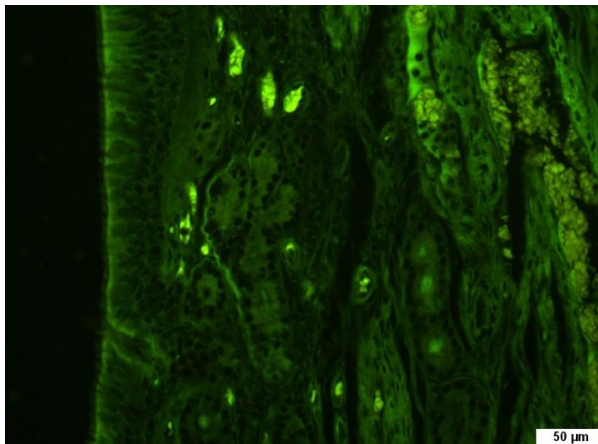


Gewebeart: Darmwand | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

Tau-Ablagerungen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: in den Ganglien ist keine Färbung zu sehen

Alles unspezifisch [B: 2]

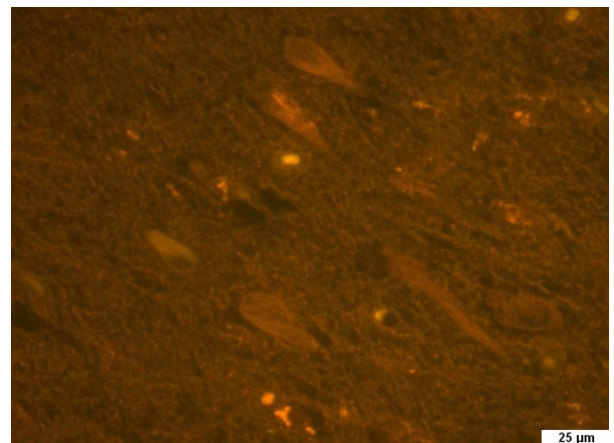
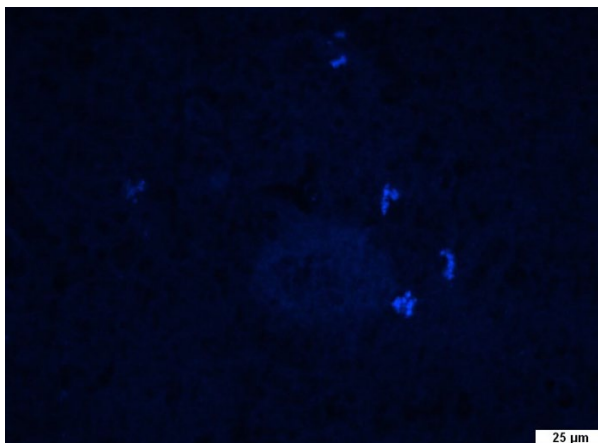


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: negativ, keine Färbung zu sehen

Bemerkungen: Färbung in den Blutgefäßen: Zerebrale Amyloidangiopathie, unklare Färbung im Epithel eventuell A β -Peptid [B: 5]

Histologie von BSc3814

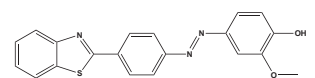


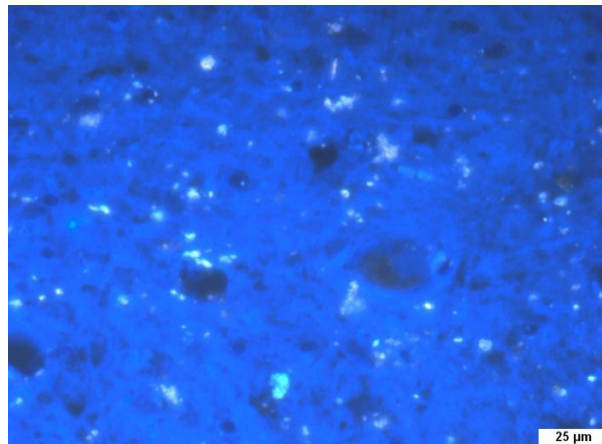
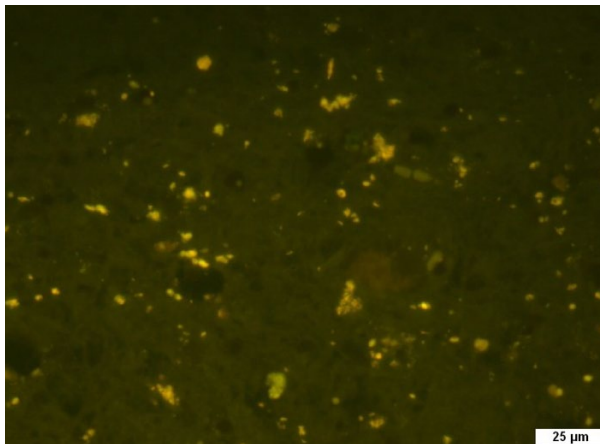
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 59

A β -Plaques: positiv, selektive Färbung, Fluoreszenz schwach

Tau-Fibrillen: positiv, selektive Färbung (siehe linkes Bild Übersicht)

Bemerkungen: viel Material auf der Oberfläche ausgefallen; Wellenlänge der Filter nicht optimal, Fluoreszenz schwach [B: 7]



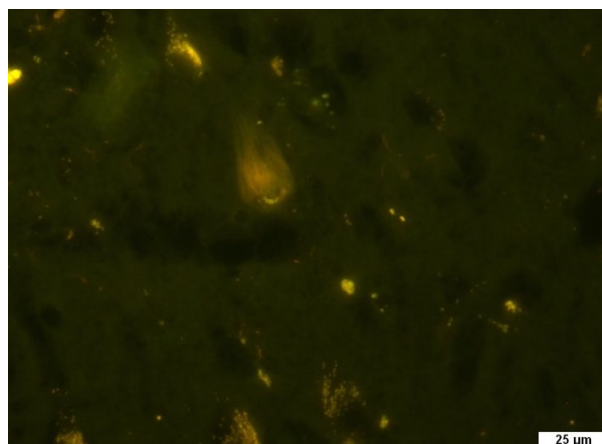
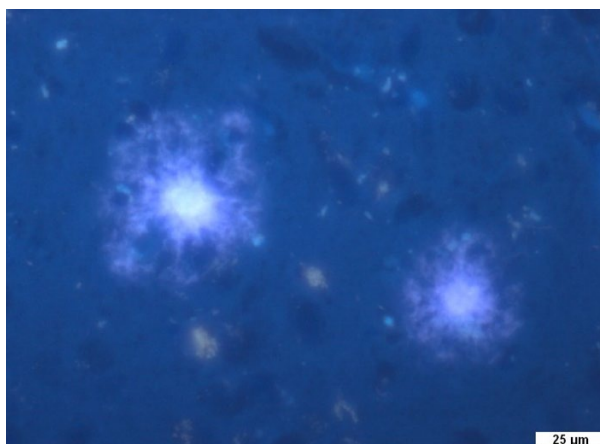


Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: Material auf der Oberfläche ausgefallen [B: 3]

Histologie von BSc2950

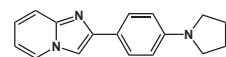


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

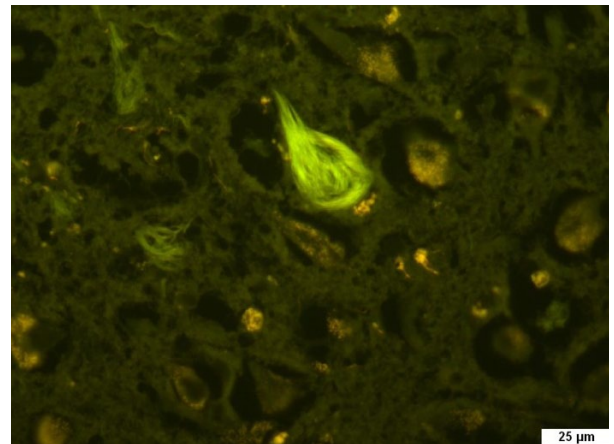
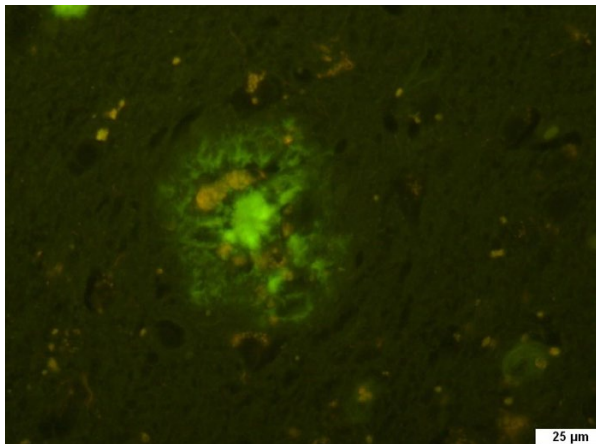
Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht, Farbeindruck rosa

Tau-Fibrillen: positiv, gute Fluoreszenz

Bemerkungen: relative starkes Fotobleaching $\Delta t < 1 \text{ min}$ [B: 7]



Histologie von BSc3765

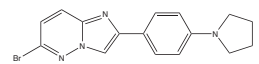


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

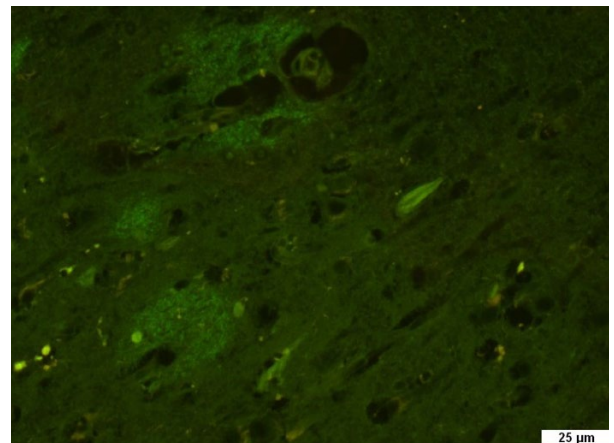
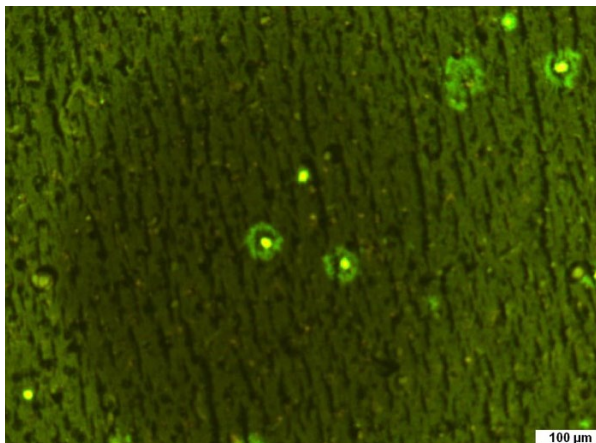
A β -Plaques: positiv, gute Übersicht, mit diffusen Amyloidablagerungen und kleinen Plaques

Tau-Fibrillen: positiv, sehr gute Fluoreszenz

Bemerkungen: [B: 10]



Histologie von BSc4090

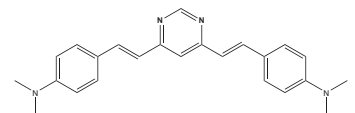


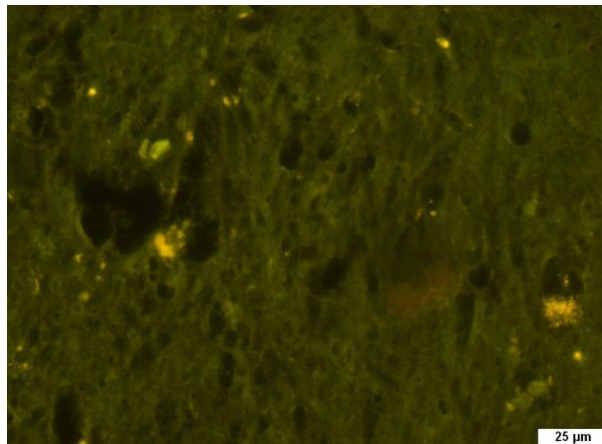
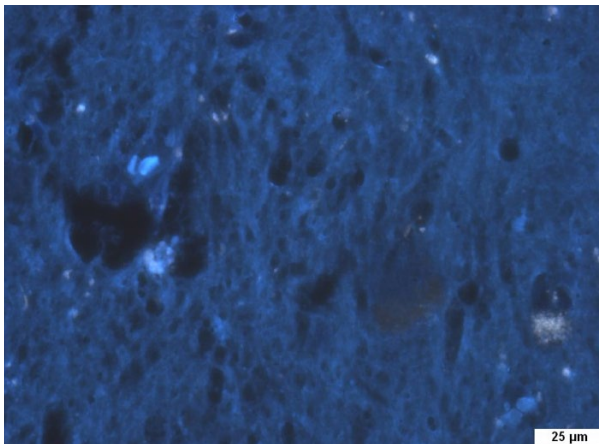
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

A β -Plaques: positiv, sehr gute Übersicht und Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr gute Färbung

Bemerkungen: kein Fotobleaching *on target*, diffuse Plaque gefärbt. [B: 13]

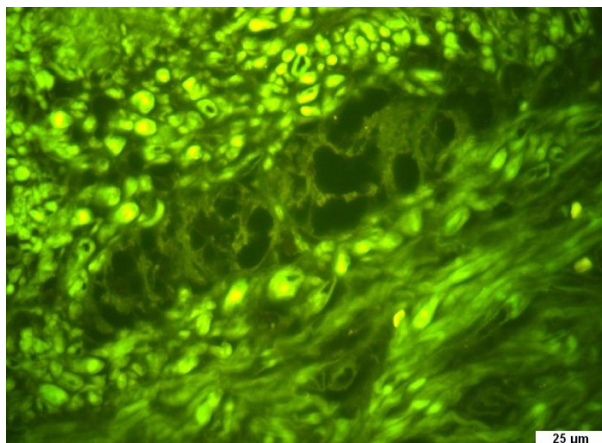




Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: gelbe positive Fluoreszenz ist Lipofuscin Autofluoreszenz [B: 2]

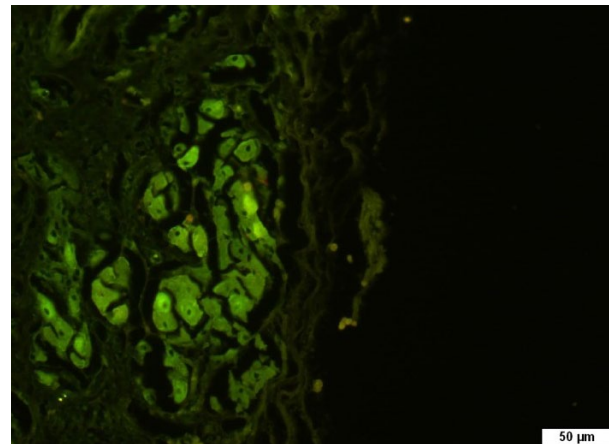
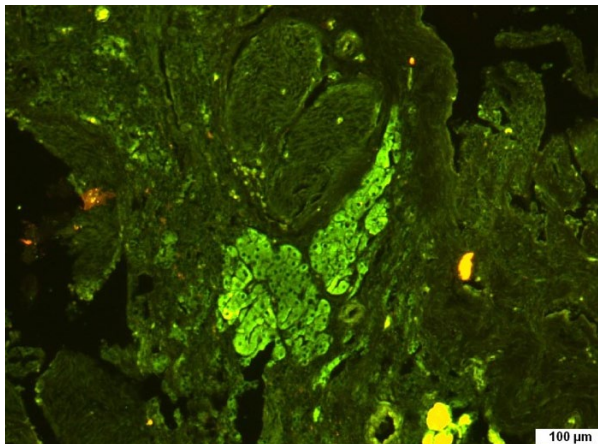


Gewebeart: Darmwand | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

Tau-Ablagerungen: negativ

Bemerkungen: Viel granuläres Lipofuscin,

Viel „unspezifische“ Färbung in der Muskulatur -> unklar Was genau [B: 2]

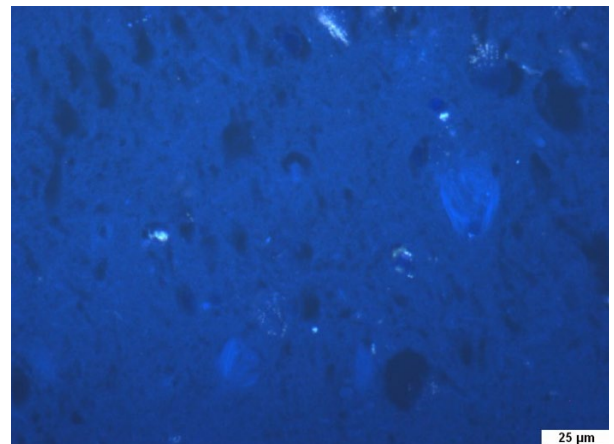
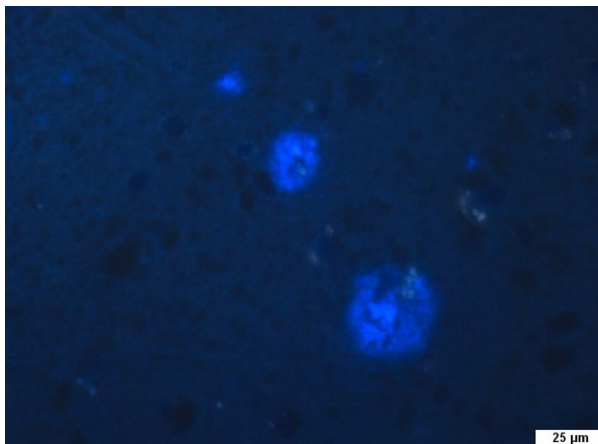


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, gute Übersicht/Kontrast/Fluoreszenz

Bemerkungen: feinere Strukturen sind ebenfalls gefärbt [B: 16]

Histologie von BSc4327

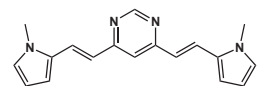


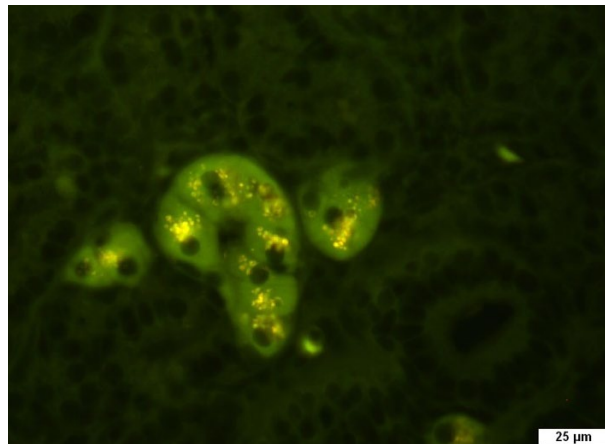
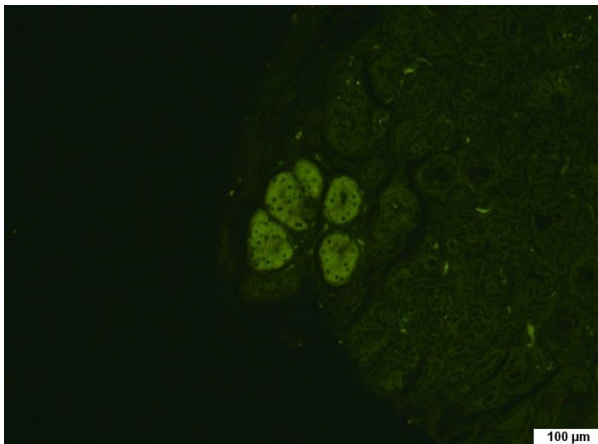
Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht

Tau-Fibrillen: positiv, schwächere Fluoreszenz

Bemerkungen: Zerebrale Amyloidangiopathie angefärbt, gut im Gefäß zu sehen [B: 7]



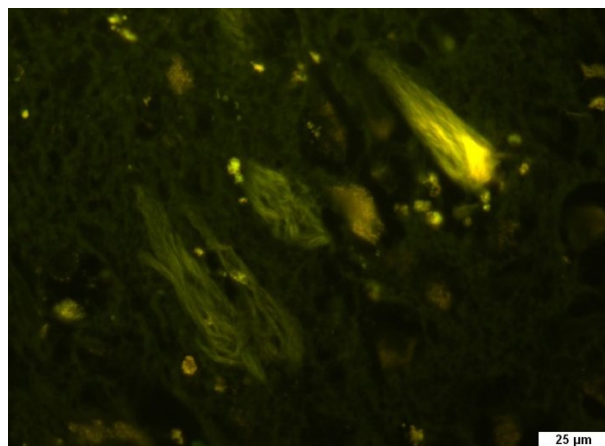
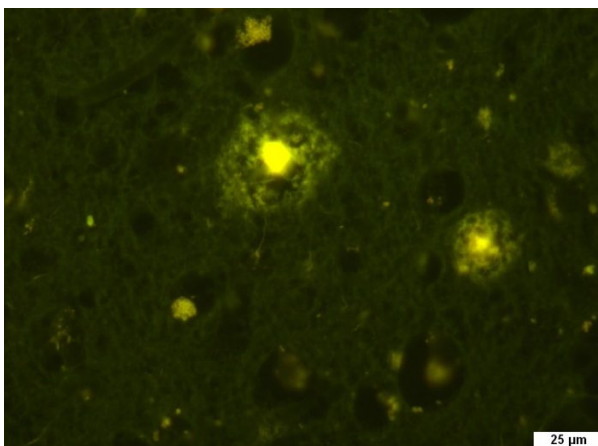


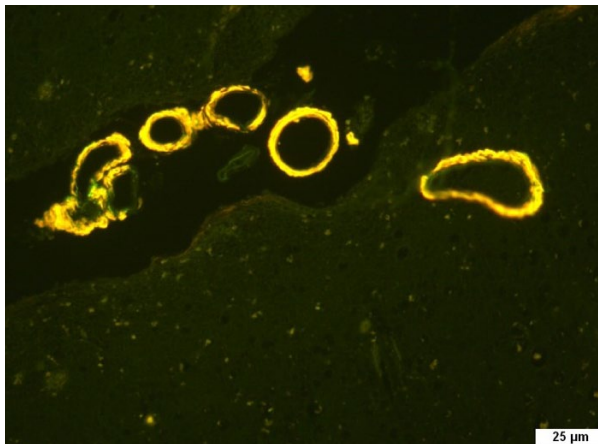
Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Baumannndrüsen: positiv, selektiv, gute Fluoreszenz

Bemerkungen: granuläre Lipufuscinablagerungen gelb in den Drüsen klar zu unterscheiden;
im Epithel: nichts signifikantes zu sehen [B: 3]

Histologie von BSc4328



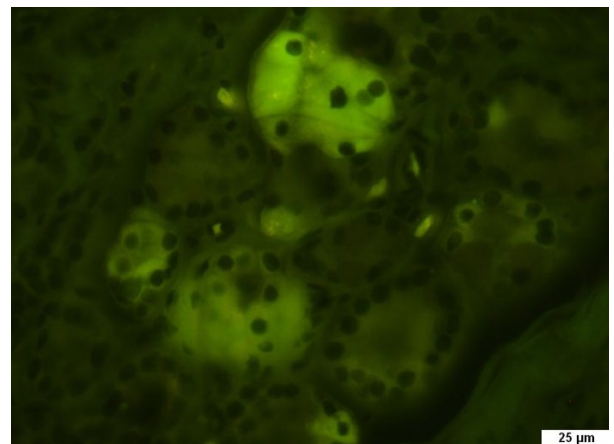
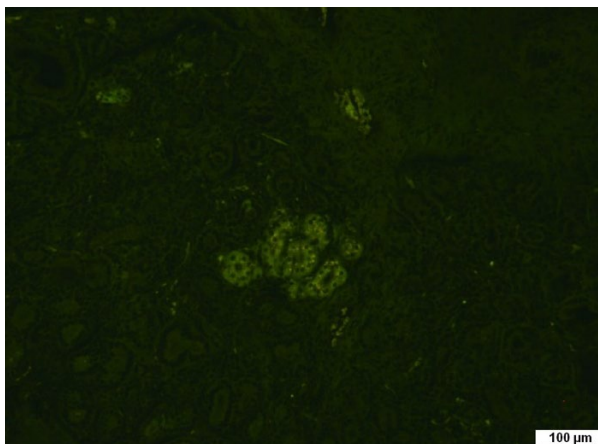
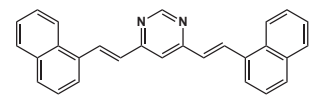


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Fluoreszenz/Kontrast

Tau-Fibrillen: positiv, gute Fluoreszenz

Bemerkungen: Zerebrale Amyloidangiopathie im Gefäß erscheint mit stärkerer Fluoreszenz Intensität [B: 8]

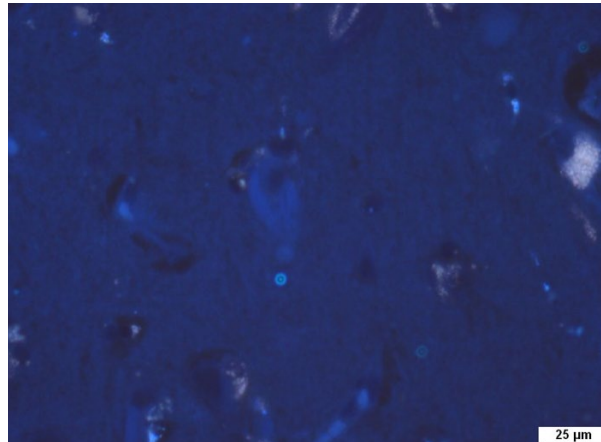
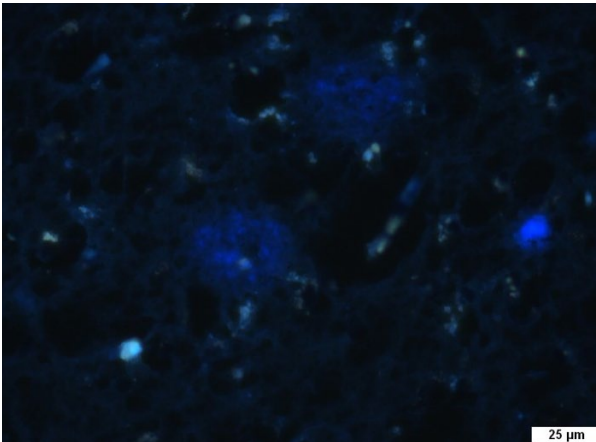


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Baumannndrüsen: positiv, selektiv, schwache Fluoreszenz

Bemerkungen: im Epithel: nichts signifikantes zu sehen [B: 3]

Histologie von BSc4519

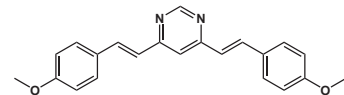


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

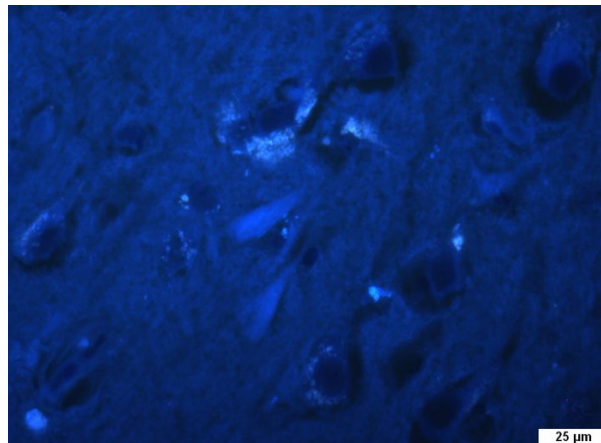
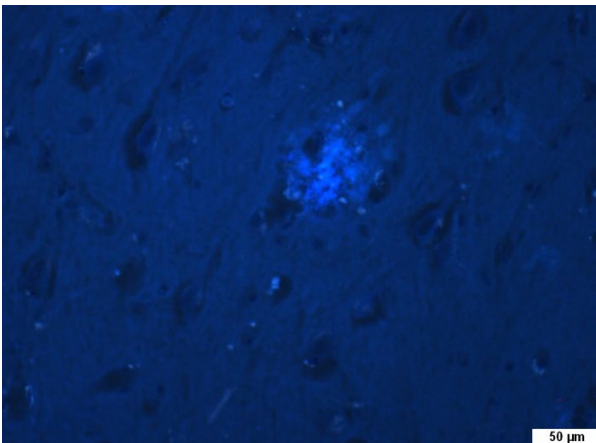
Aβ-Plaques: positiv, schwache Fluoreszenz/Kontrast

Tau-Fibrillen: positiv, schwache Fluoreszenz/Kontrast

Bemerkungen: Bleicht schnell und komplett aus [B: 4]



Histologie von BSc4309

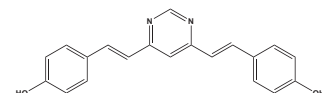


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

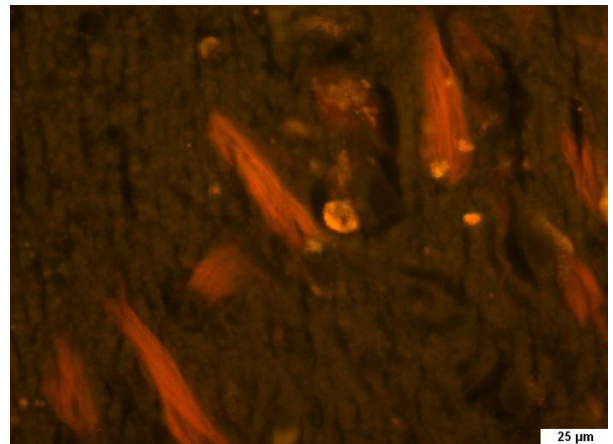
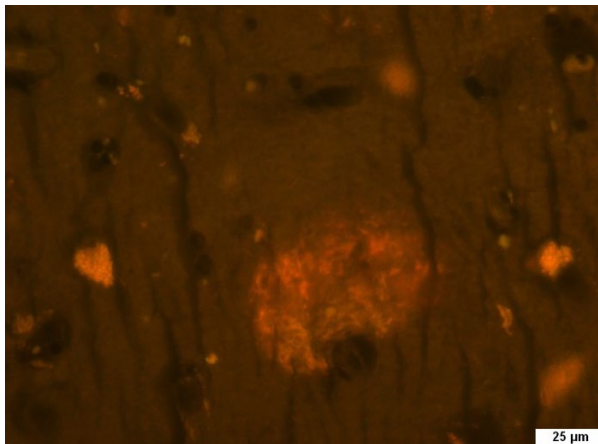
Aβ-Plaques: positiv, schwacher Kontrast/Fluoreszenz und Intensität

Tau-Fibrillen: keine Färbung

Bemerkungen: [B: 6]



Histologie von BSc4520

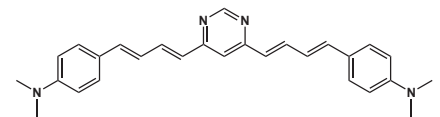


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

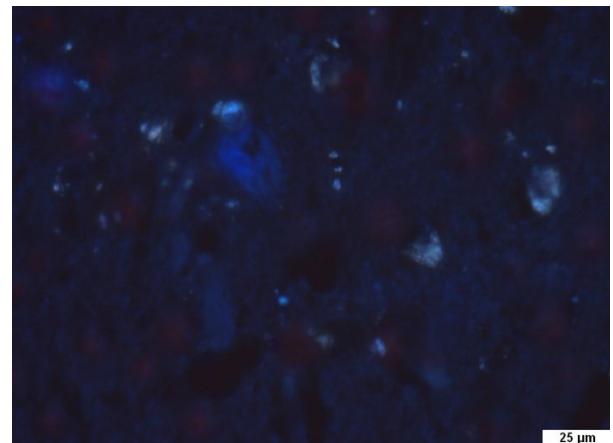
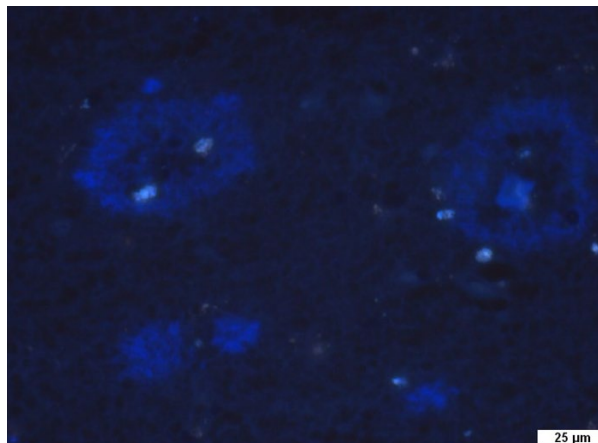
Ab-Plaques: positiv gute Färbung/Intensität

Tau-Fibrillen: positiv, guter Kontrast

Bemerkungen: FITC-Filter optimal, Hintergrund bleicht aus Färbung persistiert [B: 7]



Histologie von BSc4522

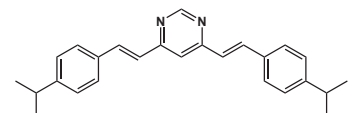


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

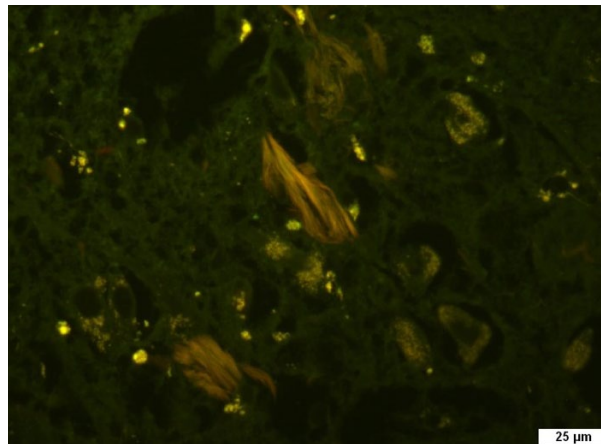
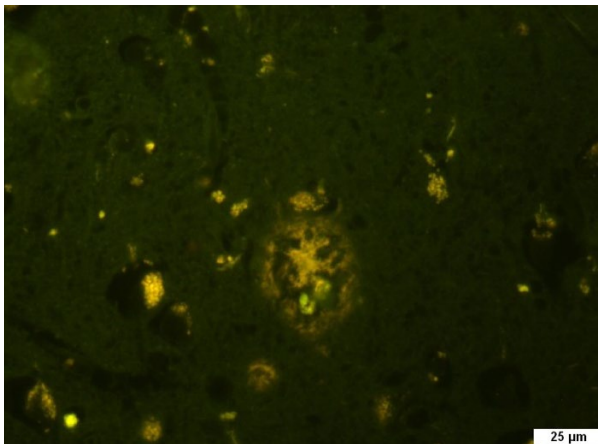
Aβ-Plaques: positiv, schwache Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ, keine spezifische und reproduzierbare Färbung

Bemerkungen: „blubber“ Effekt beim Mikroskopieren [B: 4]



Histologie von B4528

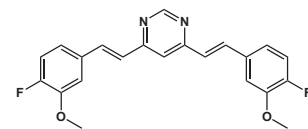


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

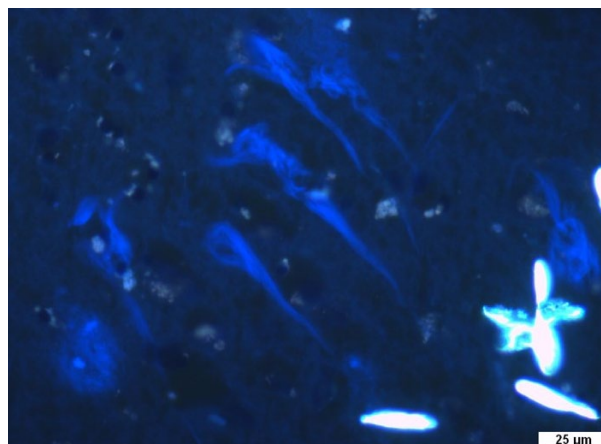
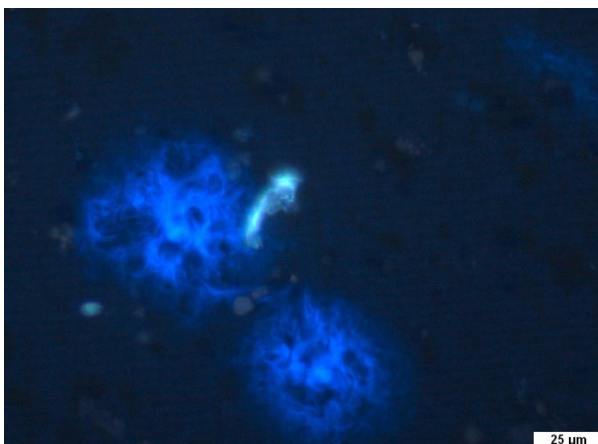
Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht

Tau-Fibrillen: positiv, gute Fluoreszenz, rosa/rötlicher Farbeindruck

Bemerkungen: Teilweise viel ausgefallenem Material auf der Oberfläche [B: 8]



Histologie von BSc4311



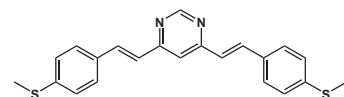
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht, sehr detaillierte Struktur

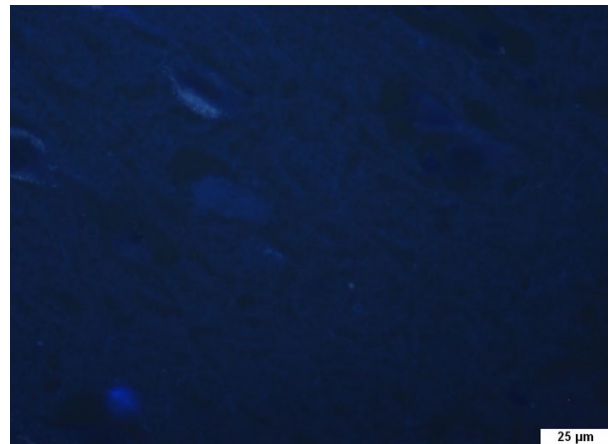
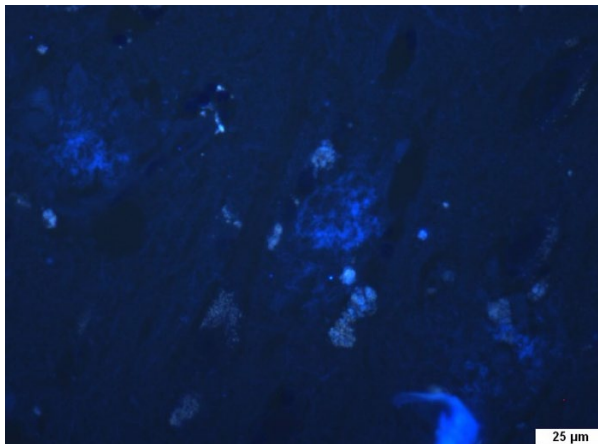
Tau-Fibrillen: positiv, gute Übersicht, sehr detaillierte Struktur

Bemerkungen: gute Fluoreszenz; Kristalle auf der Oberfläche ausgefallen, Zerebrale Amyloid-angiopathie in den Blutgefäßen super angefärbt;

Löslichkeit und Galenik Problemematisch [B: 4]



Histologie von BSc4523

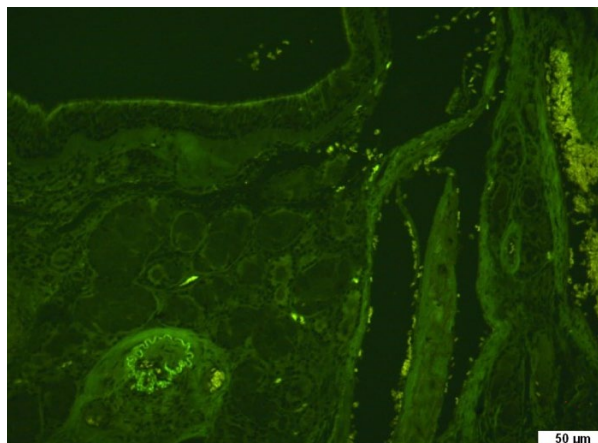
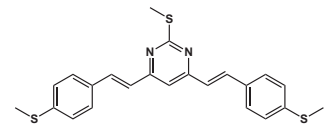


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

Aβ-Plaques: positiv, sehr gute Färbung/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung (linkes Bild)

Bemerkungen: selektiv auf Aβ (siehe auch Nasen Ergebnisse) [B: 2]

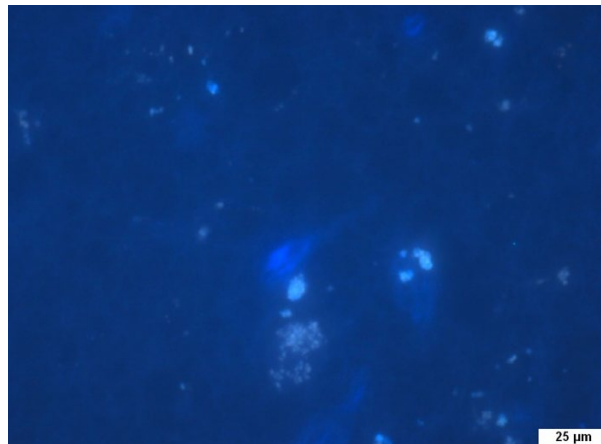
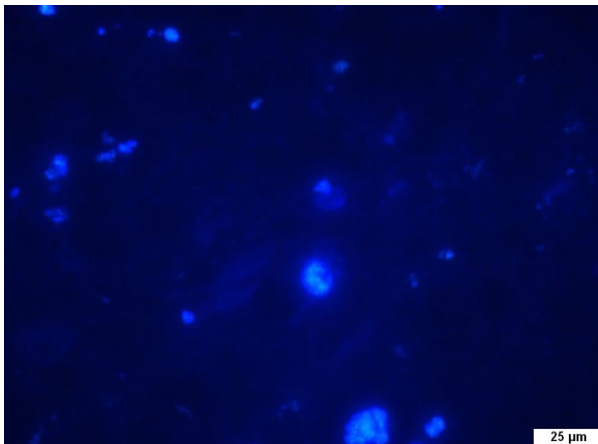


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: Die elastischen Fasern der Arterie sind gefärbt (Aβ) [B: 3]

Histologie von BSc4524

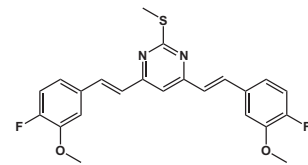


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

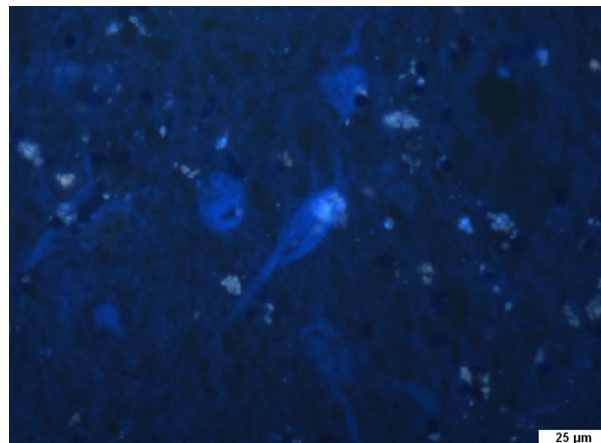
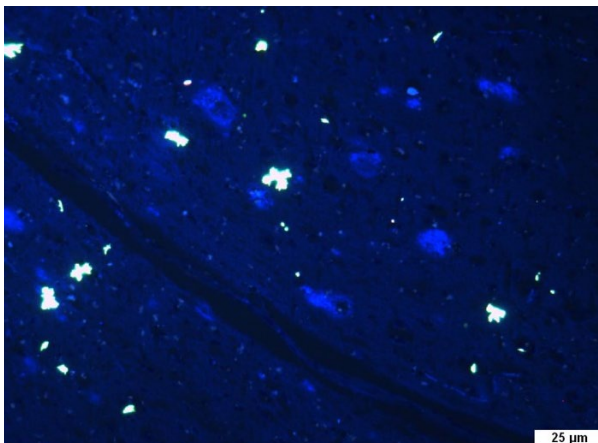
Aβ-Plaques: positiv, schwache Färbung/Kontrast/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr schwache Färbung

Bemerkungen: Farbstoff auf der Oberfläche ausgefallen (Streulicht Probleme) [B: 7]



Histologie von BSc4527



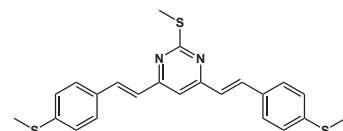
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Fluoreszenz

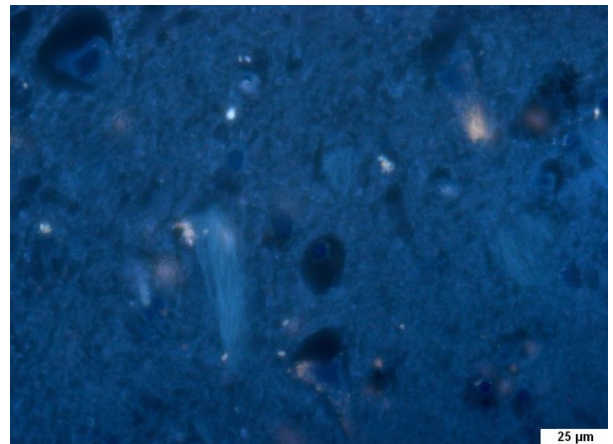
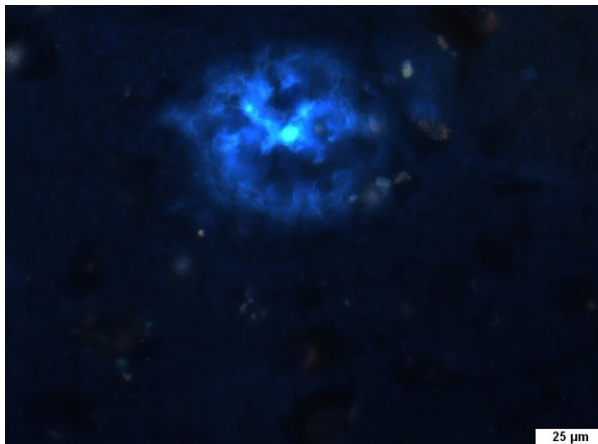
Tau-Fibrillen: positiv, aber schwächere Fluoreszenzintensität als auf den Aβ-Plaques

Bemerkungen: viel Material auf der Oberfläche ausgefallen

nur der Hintergrund bleicht aus; Fluoreszenz relativ schwächer als bei BSc4308 [B: 4]



Histologie von BSc4309

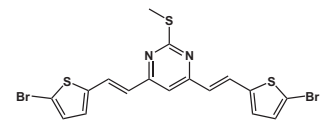


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

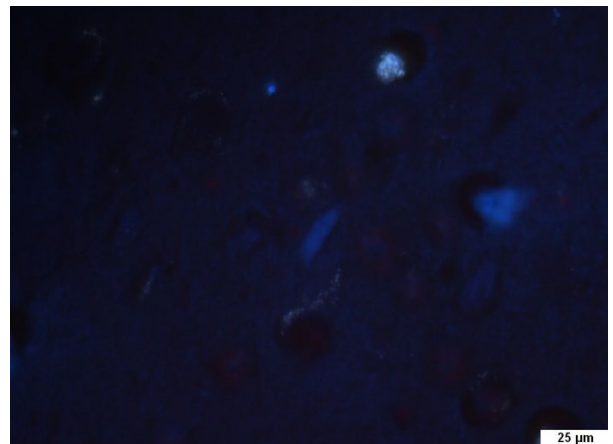
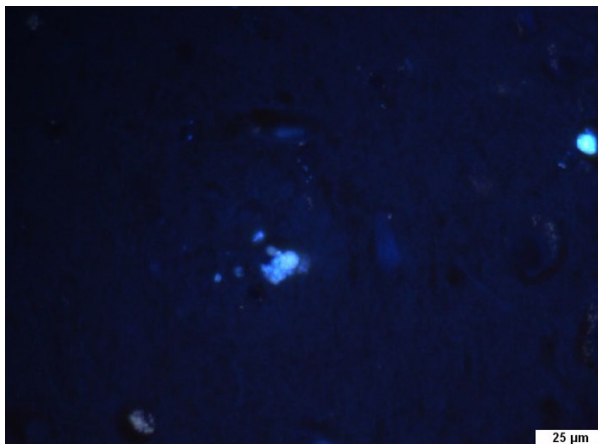
Ab-Plaques: positiv, schwacher Kontrast/Intensität

Tau-Fibrillen: positiv, schwacher Kontrast/Intensität

Bemerkungen: Farbeindruck im DAPI-filter: grün bis türkis [B: 7]



Histologie von BSc4227

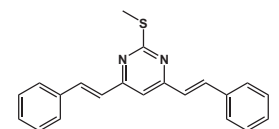


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

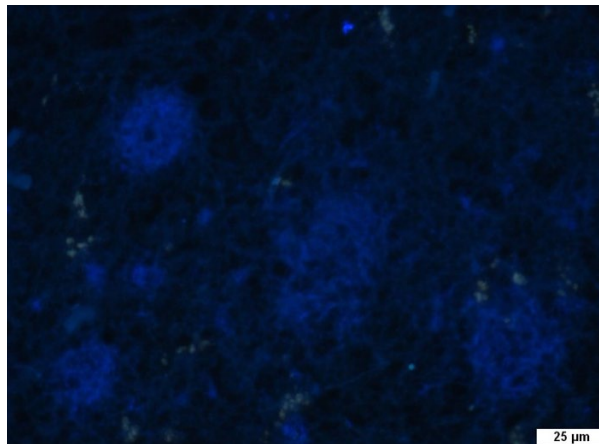
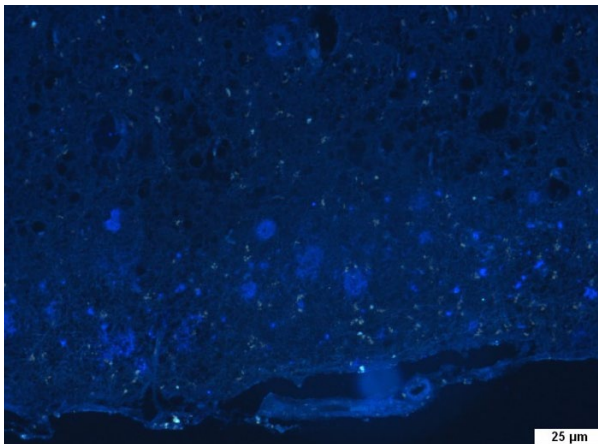
Aβ-Plaques: positiv, Kern der Plaque gut gefärbt

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: viel Lipofuscin im Gewebe [B: 3]



Histologie von BSc4224

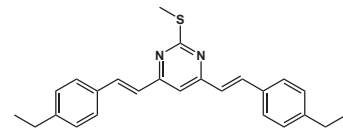


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

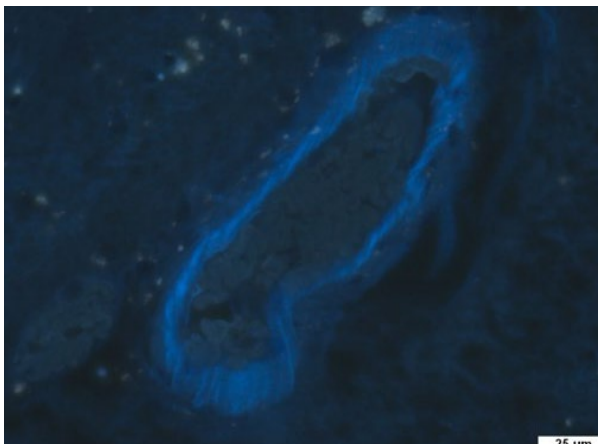
Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Kontrast

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: viel *Fleecy* Amyloid, Verdacht auf schlechte Galenik [B: 2]



Histologie von BSc4225

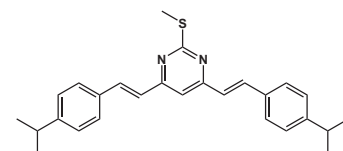


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

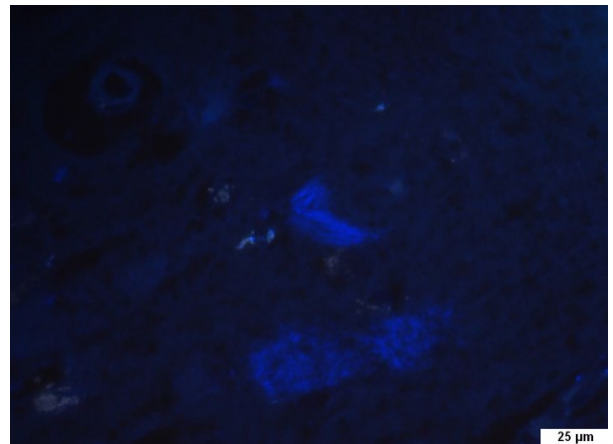
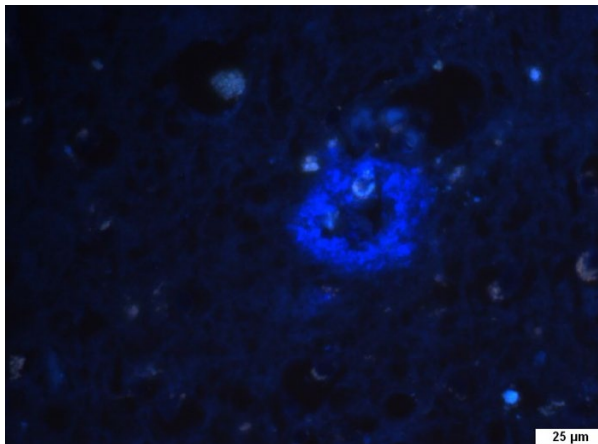
Aβ-Plaques: negativ, keine Färbung

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: Kollagenfärbung im Blutgefäß
(Qualität vergleichbar mit Congorot) [B: 1]



Histologie von BSc4229

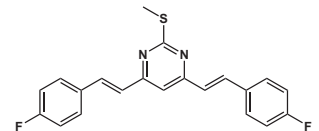


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

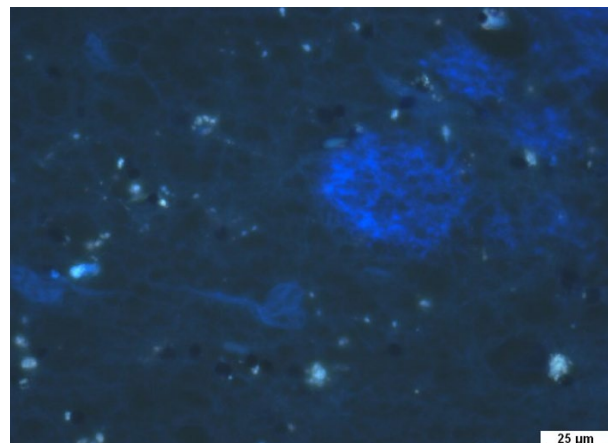
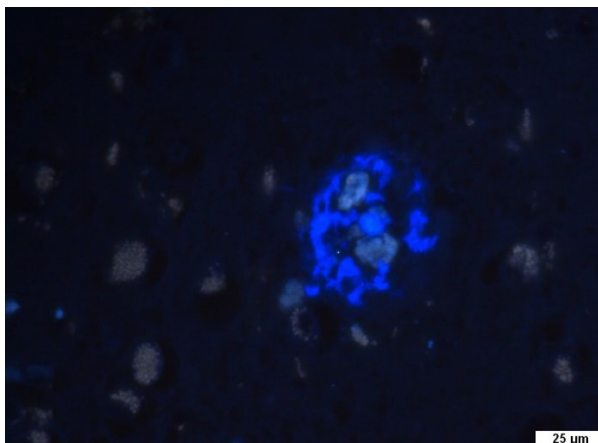
Aβ-Plaques: positiv, schlechter Kontrast, schwache Fluoreszenz
(aktive Plaque linkes Bild)

Tau-Fibrillen: positiv, deutlich schwächer gefärbt

Bemerkungen: starkes Fotobleaching ($\Delta t = \text{sec}$); Fibrillen teilweise negativ (Galenik?) [B: 9]



Histologie von BSc4228

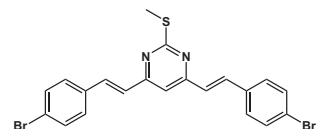


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

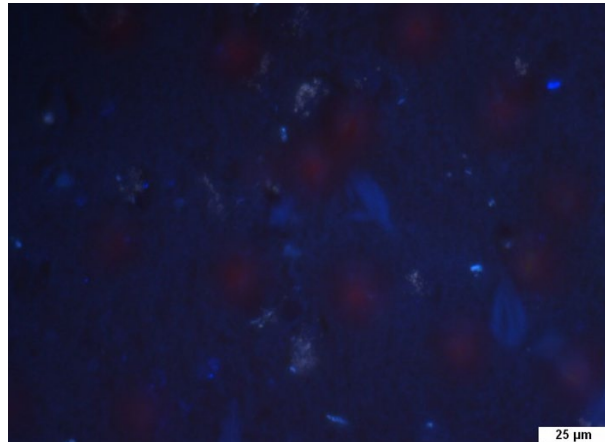
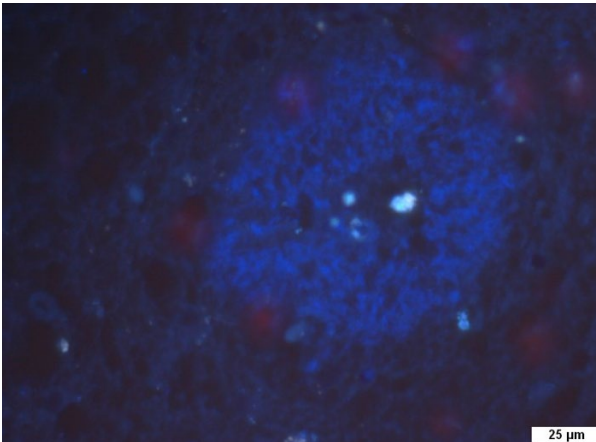
Aβ-Plaques: positiv, blaue stabile Färbung, Hintergrund
bleicht aus, diffuse Plaque

Tau-Fibrillen: positiv, deutlich schwächere Färbung/Fluoreszenz
als auf Plaques

Bemerkungen: guter Kontrast gegen Lipofuscin [B: 6]



Histologie von BSc4226

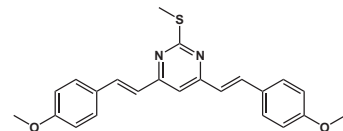


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

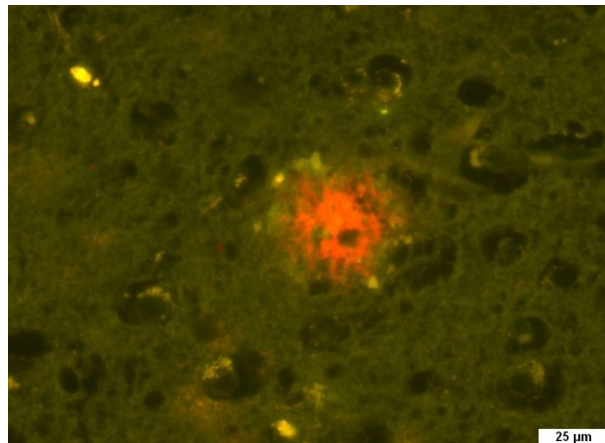
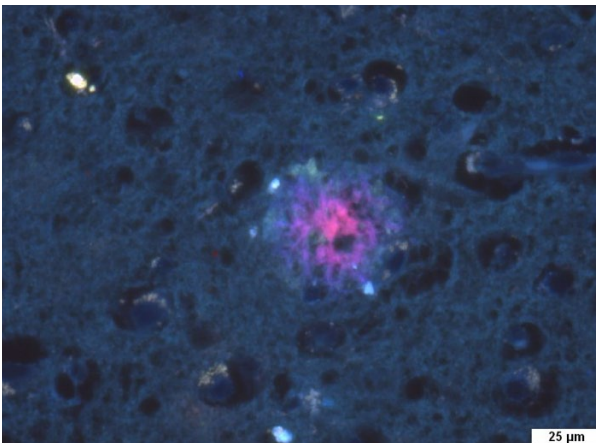
Aβ-Plaques: positiv, Fluoreszenz mittelmäßig

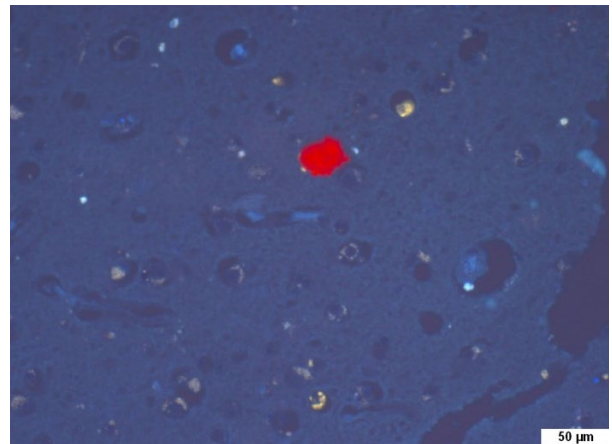
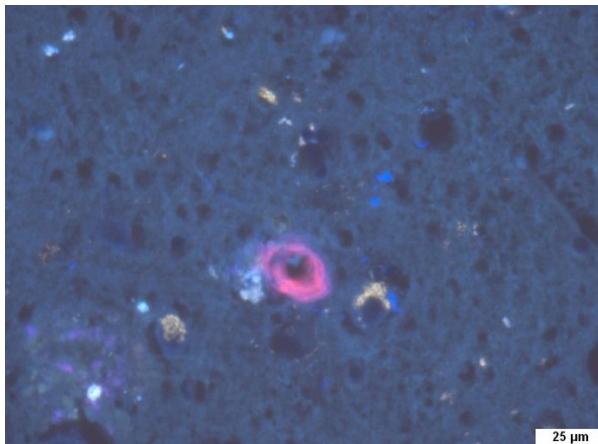
Tau-Fibrillen: positiv, sehr schwach Gefärbt

Bemerkungen: bleicht schnell aus [B: 3]



Histologie von BSc4223





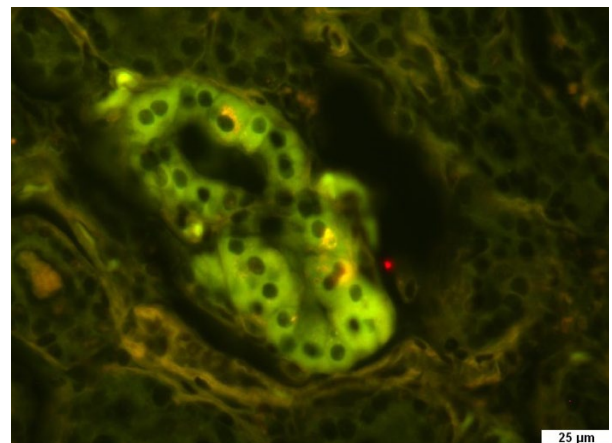
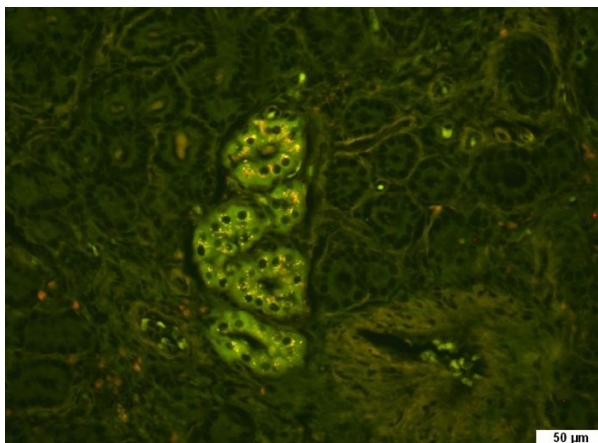
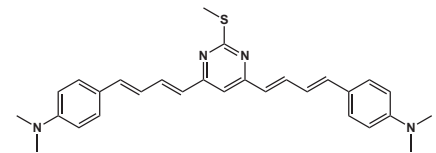
Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

Aβ-Plaques: positiv, Farbeindruck: rote Plaques im FITC-Filter; knackig orange im AURAMIN-Filter

Tau-Fibrillen: negativ, keine Fibrillen gefärbt (linkes Bild; Kristall auf der Oberfläche rot)

Bemerkungen: eventuell Kongofile Amyloid Angiopathie

(Verdacht auf Tau) keine roten Tangles gefunden, teilweise Material auf der Oberfläche ausgefallen [B: 5]

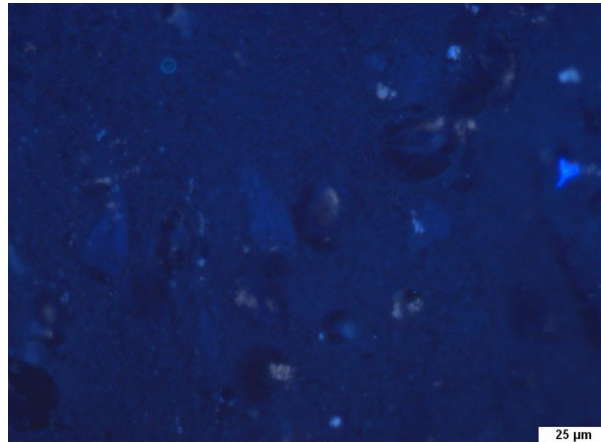
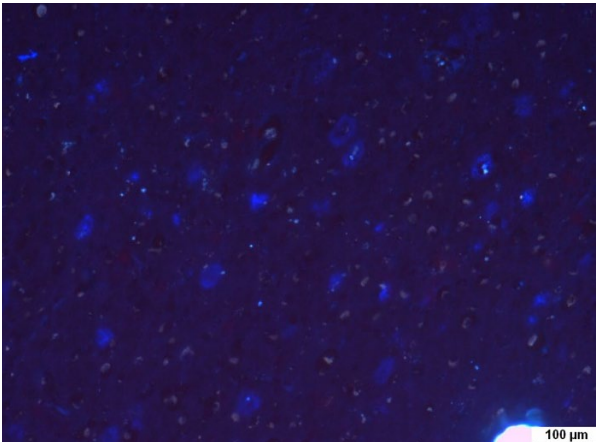


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Baumannndrüsen: positiv, selektiv, gute (gelbgrünliche) Fluoreszenz/Kontrast

Bemerkungen: Epithel eventuell [B: 3]

Histologie von BSc4326

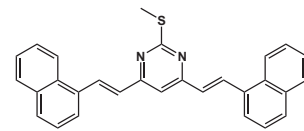


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

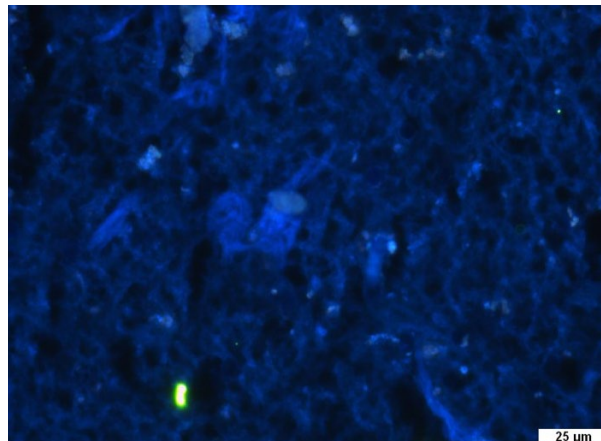
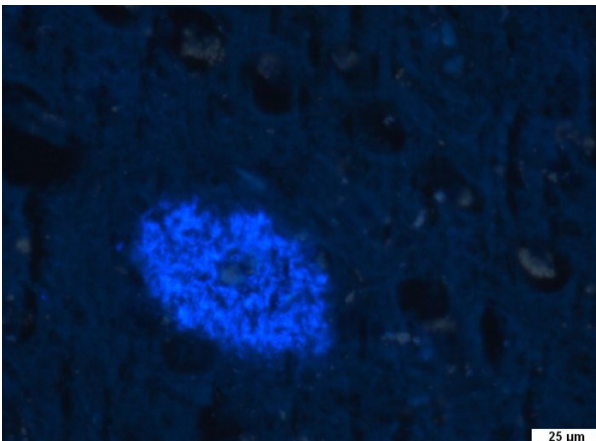
Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Kontrast/Fluoreszenz;

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: Dentrinen und *Fleecy* Amyloid ebenfalls gefärbt, viel Material auf der Oberfläche ausgefallen (Galenik Probleme) [B: 5]



Histologie von BSc4097



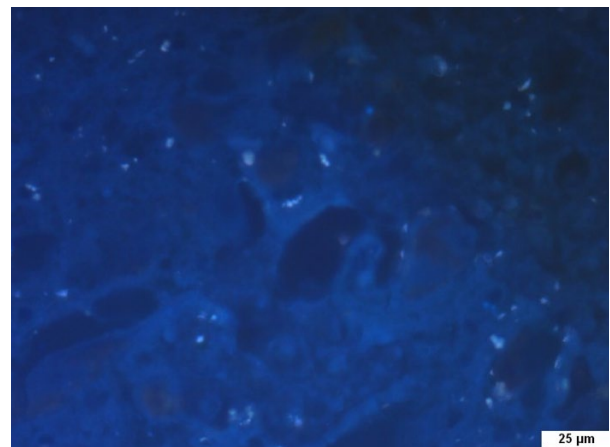
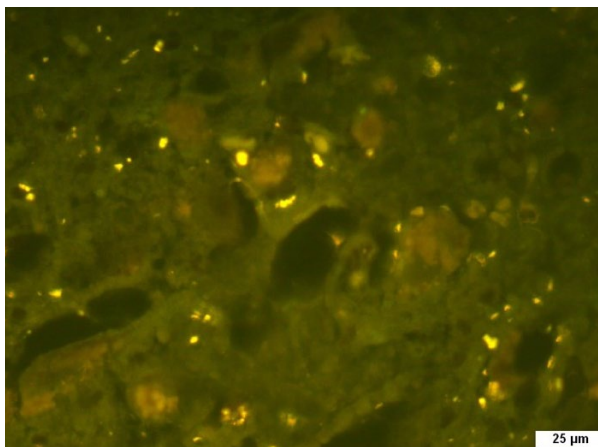
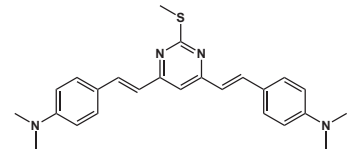
Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

A β -Plaques: positiv, sehr guter Kontrast (spezifisch/selektiv) /

Fluoreszenz geht ins bläuliche, Gut auch auf *Fleecy* Amyloid

Tau-Fibrillen: positiv, schwacher Kontrast/Fluoreszenz

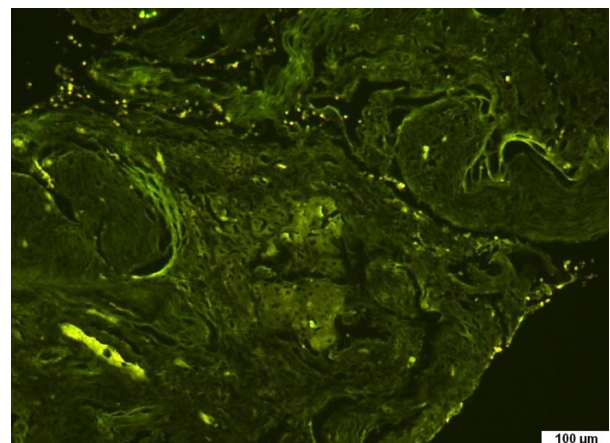
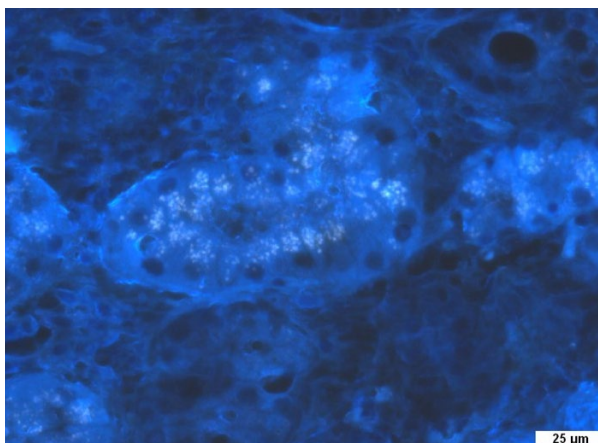
Bemerkungen: Zerebrale Amyloidangiopathie ebenfalls gut gefärbt, Kontrast Top, „blubber“ Effekt tritt teilweise auf, Material auf der Oberfläche ausgefallen [B: 21]



Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: DAPI, FITC-Filter [B: 7]

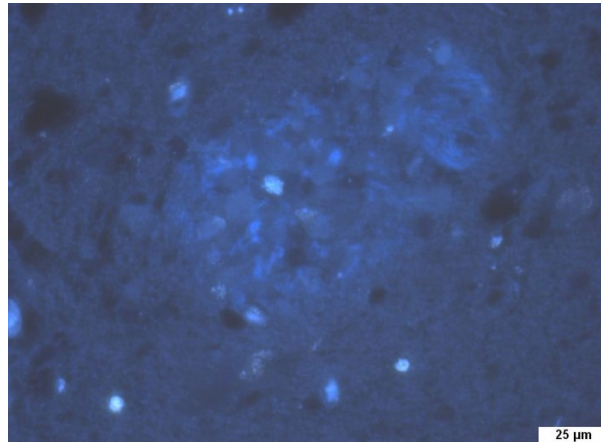
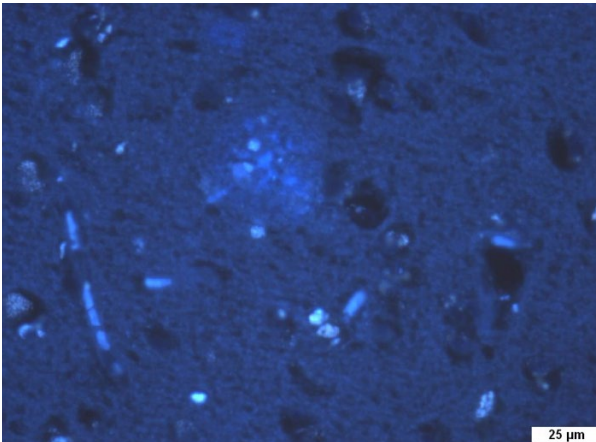


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv; ungeklärte Feinstruktur mit granulärem Kontrast

Bemerkungen: ungeklärte Feinstruktur scheint kein Lipofuscin zu sein [B: 8]

Histologie von BSc4559

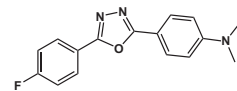


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

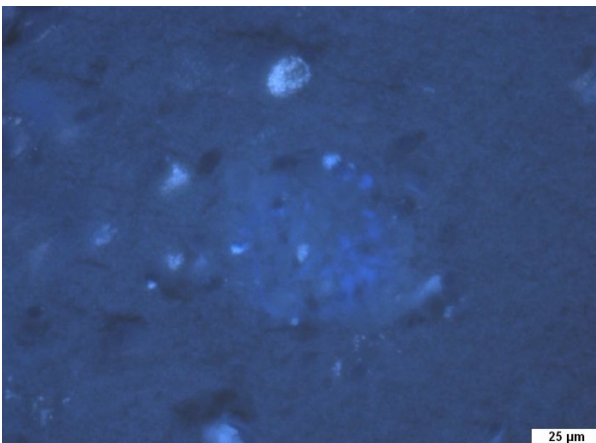
Aβ-Plaques: positiv, schwache Färbung/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ, nicht gefärbt neben Plaque (siehe rechtes Bild)

Bemerkungen: [B: 2]



Histologie von BSc4525

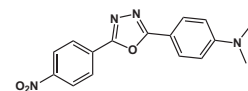


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

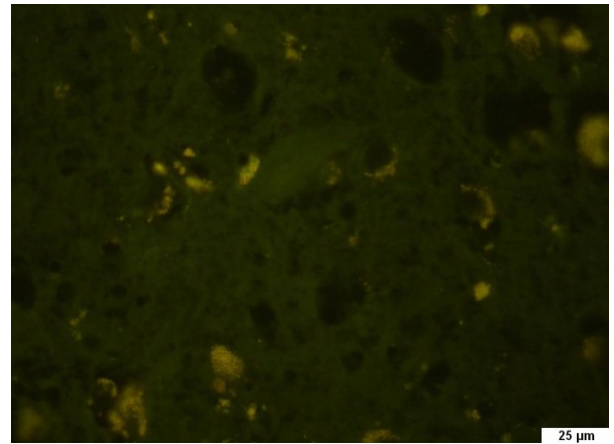
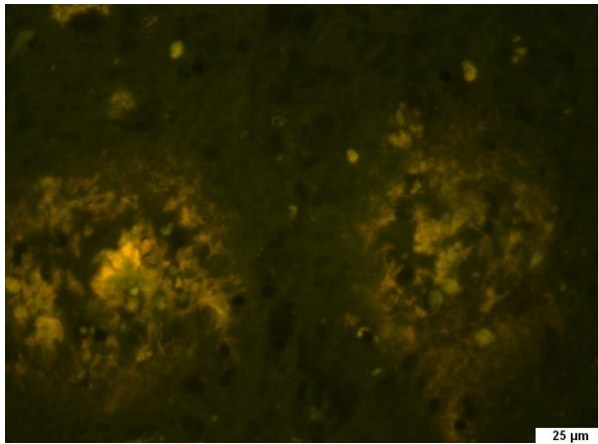
Aβ-Plaques: positiv, sehr schwacher Kontrast/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ, keine gefärbte Fibrillen gefunden

Bemerkungen: [B: 1]



Histologie von BSc4526

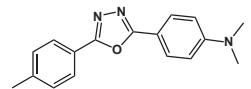


Gewebeart: AH | Patient: männlich | Alter: 67

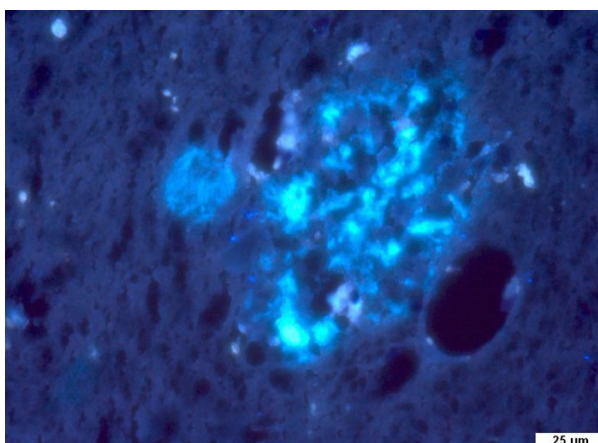
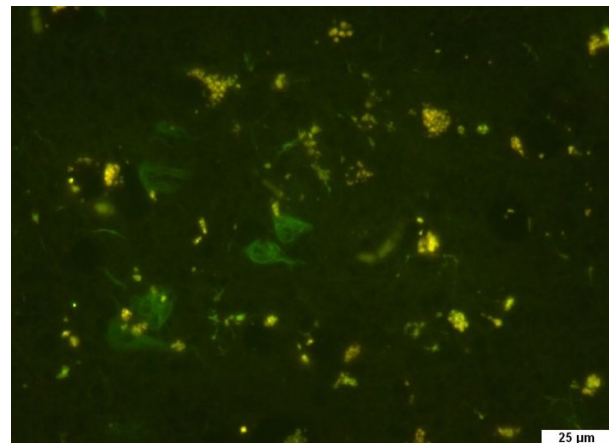
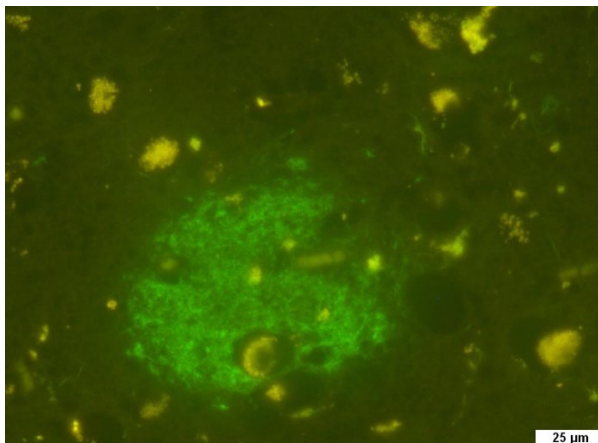
Aβ-Plaques: positiv, selektiv, Fluoreszenz gut

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

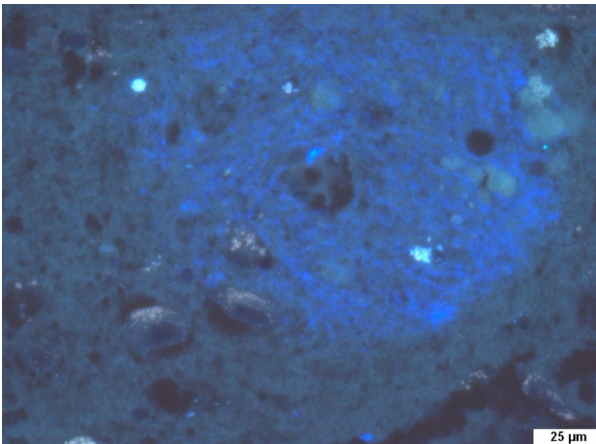
Bemerkungen: Farbeeindruck orange [B: 2]



Histologie von BSc4076



Histologie von BSc4187

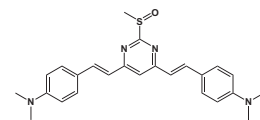


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

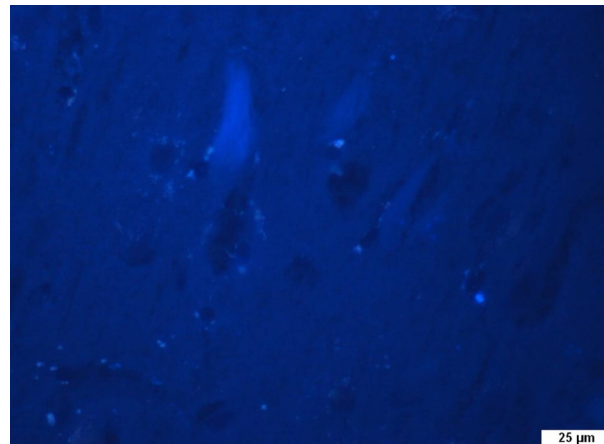
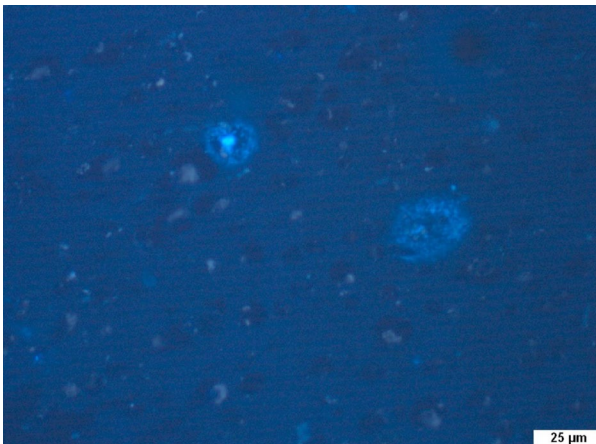
Aβ-Plaques: positiv, selektiv, Fluoreszenz gut

Tau-Fibrillen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: [B: 1]



Histologie von BSc4359

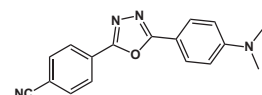


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

Aβ-Plaques: positiv, selektiv, Fluoreszenz gut

Tau-Fibrillen: positiv, schwache Färbung, Fluoreszenz/Kontrast mäßig

Bemerkungen: [B: 10]

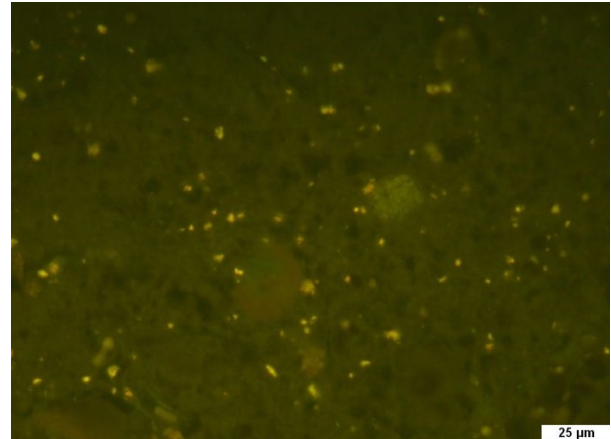
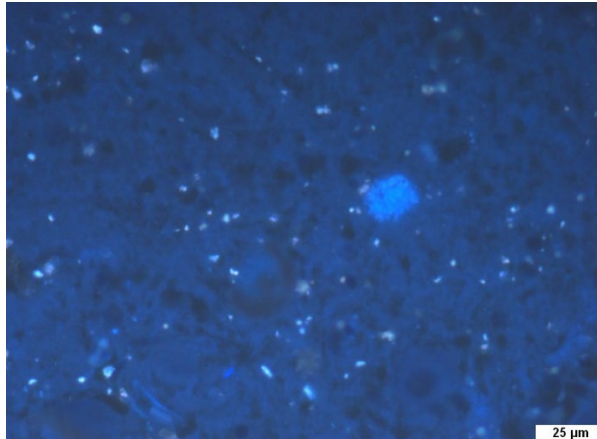
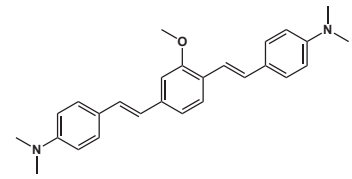


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

A β -Plaques: positiv, sehr gute Übersicht/Kontrast/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr gute Übersicht/Kontrast/Fluoreszenz

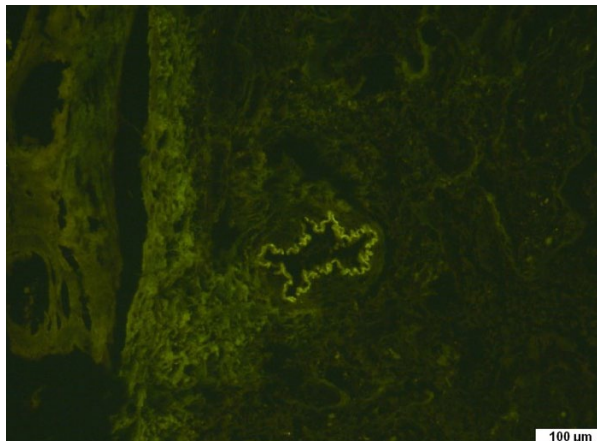
Bemerkungen: Starkes Fotobleaching (Δt = min),
klassischer kernhaltiger Plaque bleicht langsamer [B: 8]



Gewebeart: Substantia nigra | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

a-Synuclein: negativ

Bemerkungen: DAPI, FITC Filter; Material auf der Oberfläche Auskristallisiert [B: 7]

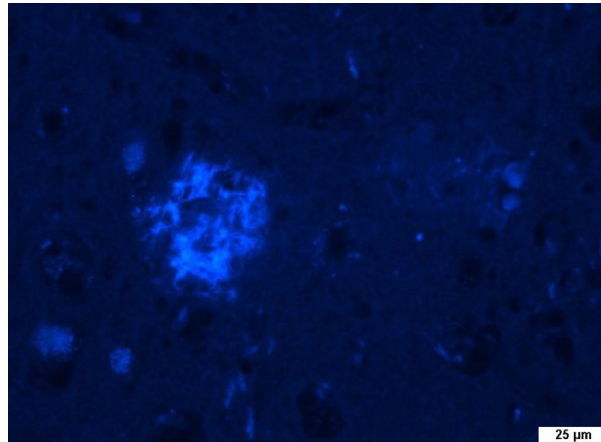
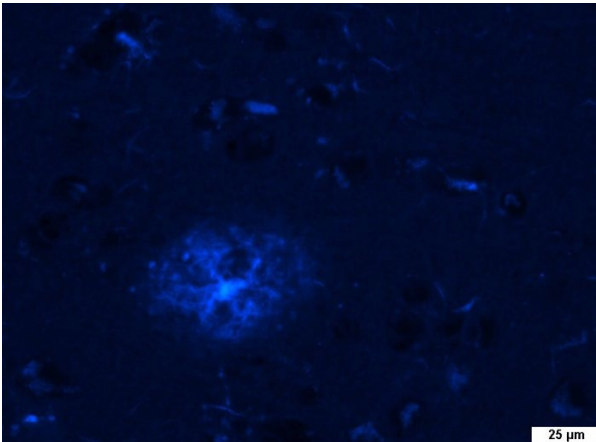


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: negativ, kein Befund

Bemerkungen: Färbung der Blutgefäße und der elastischen Fasern [B: 4]

Histologie von BSc4184

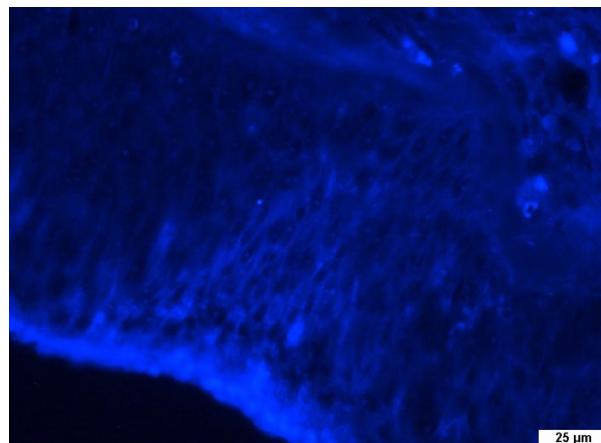
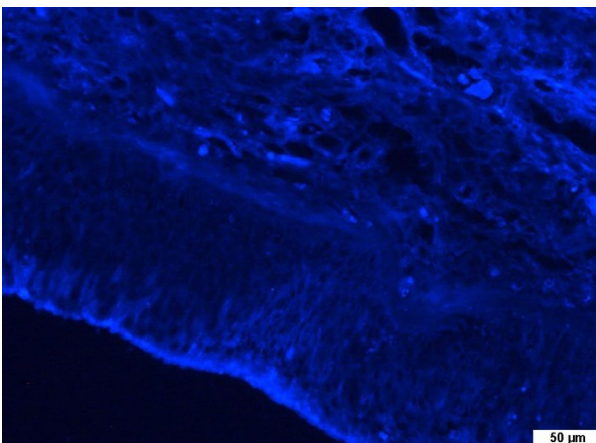
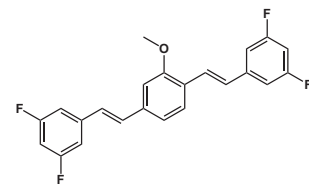


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

Aβ-Plaques: positiv, selektiv, Fluoreszenz ähnlich Lipofuscin
dadurch Kontrast mäßig

Tau-Fibrillen: negativ, keine Fibrillen gefunden

Bemerkungen: Gewebe teilweise stark verdaut [B: 2]

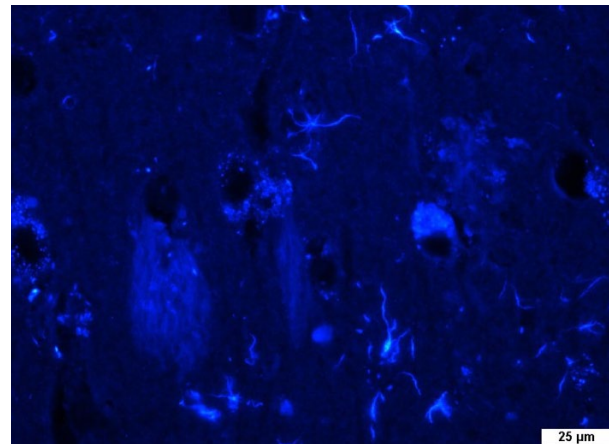
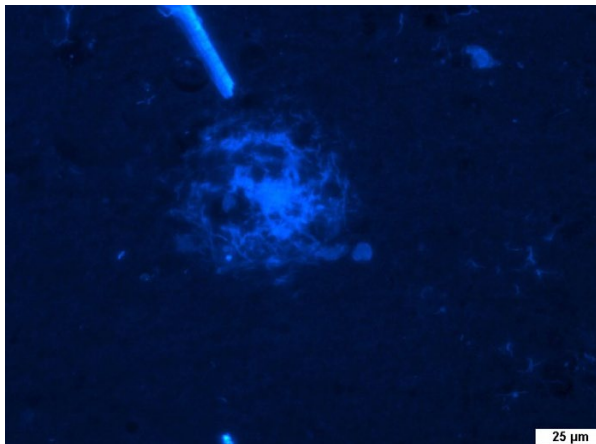


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Bowmandrüsen: negativ, keine Befund

Bemerkungen: Gewebe zum Teil stark verdaut, unklare Färbung im Epithel [B: 7]

Histologie von BSc4358



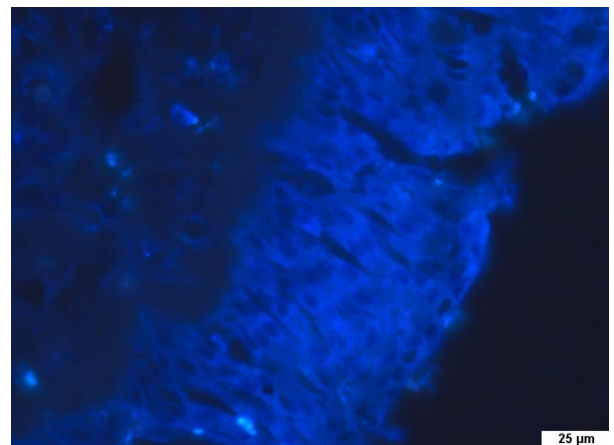
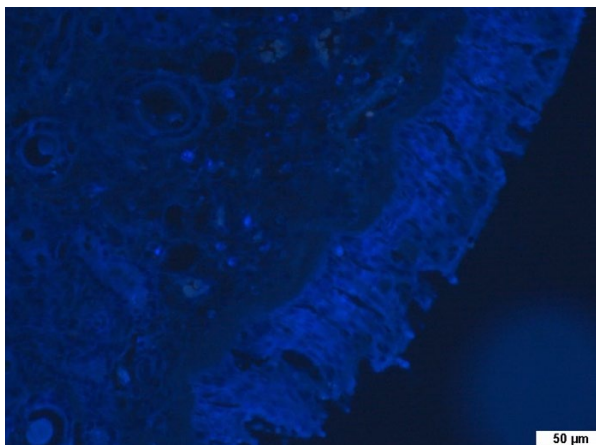
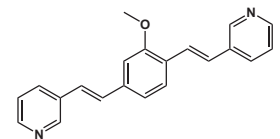
Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Kontrast

Tau-Fibrillen: positiv, gute Übersicht/Kontrast

Bemerkungen: DAPI Filter gut geeignet,

Färbung in EtOH, trotz guter Löslichkeit viel Material auf der Oberfläche ausgefallen [B: 8]

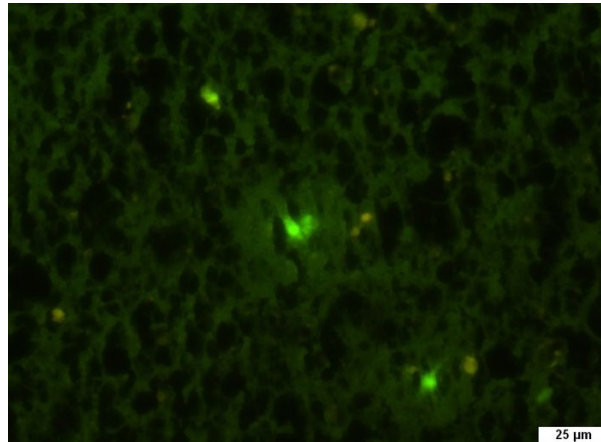
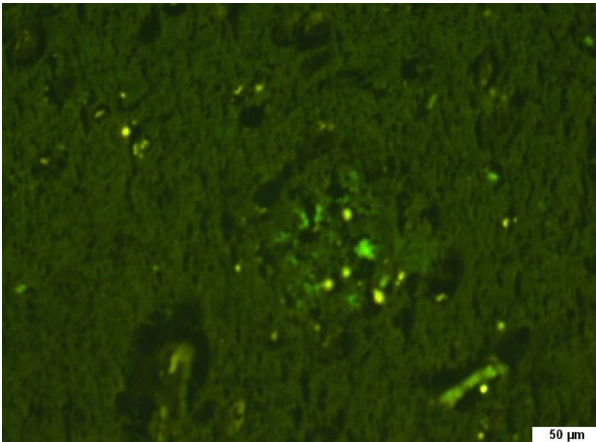


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: negativ, kein Befund

Bemerkungen: unklare Areale im Nerv und im Epithel [B: 5]

Histologie von BSc4185

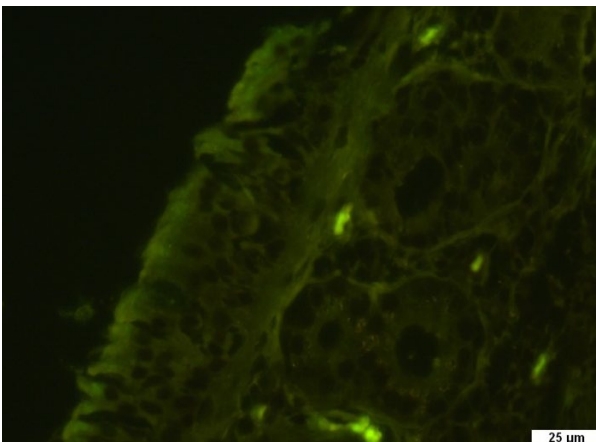
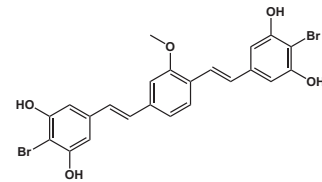


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

A β -Plaques: positiv, schwache Färbung

Tau-Fibrillen: negativ, keine Fibrillen gefunden

Bemerkungen: Sehr starkes Fotobleaching $\Delta t = < 30$ sec. [B: 2]

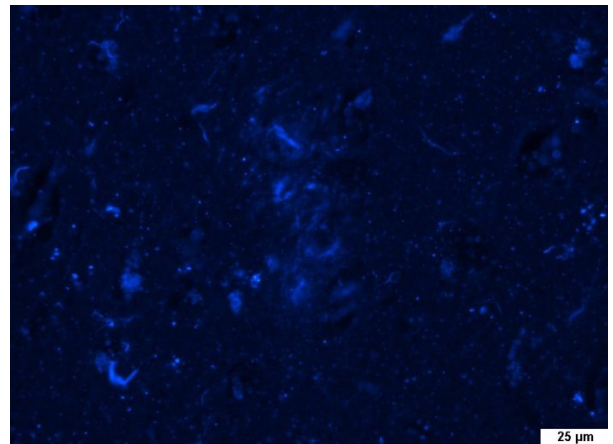
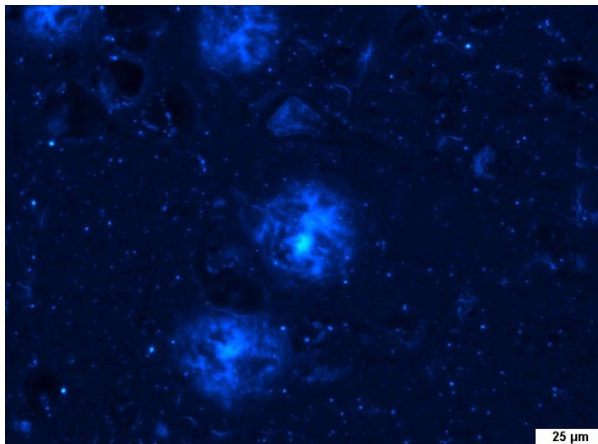


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Bowmandrüsen: negativ, keine Befund

Bemerkungen: keinerlei spezifische Färbung zu sehen [B: 4]

Histologie von BSc4356



Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

A β -Plaques: positiv, sehr gute Übersicht/Fluoreszenz/Kontrast

Tau-Fibrillen: positiv, gute Fluoreszenz

Bemerkungen: Aquafilter; Starkes Fotobleaching $\Delta t = < 1$ min

(Gewebe abhängig), viel Material auf Oberfläche

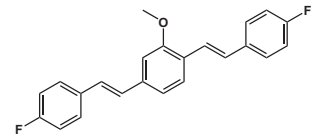
ausgefallen; (besser als Thioflavin) [B: 5]

keine Abbildung:

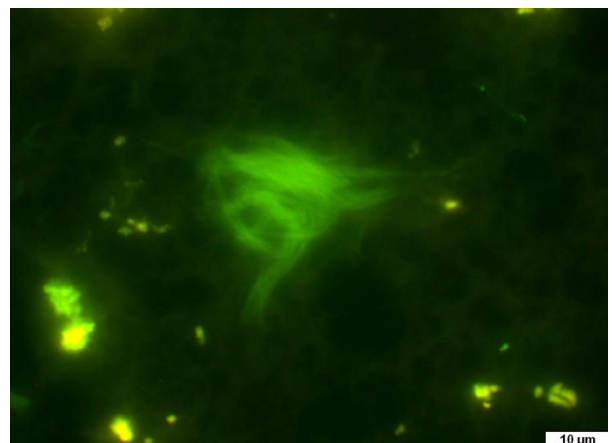
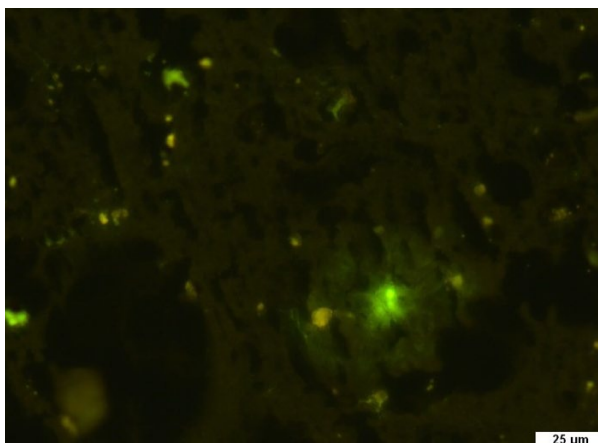
Gewebeart: Riechschleimhaut **Patient:** männlich; **Alter:** 89

Bowmandrüsen: negativ

Bemerkungen: Gewebe stark verquollen, keine belastbare Aussage möglich [B: 5]



Histologie von BSc4186



Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

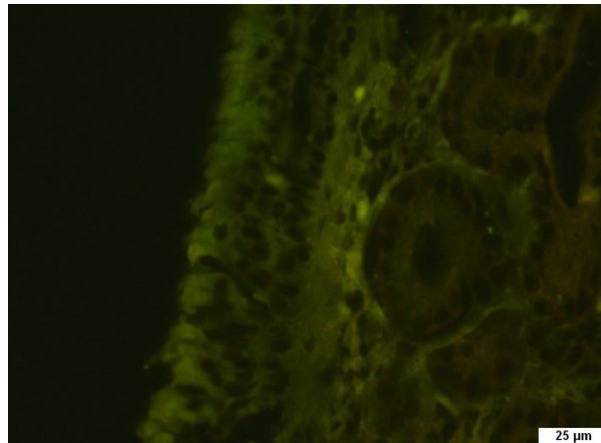
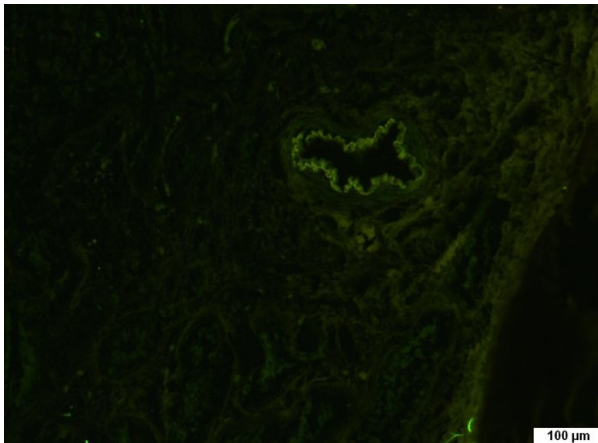
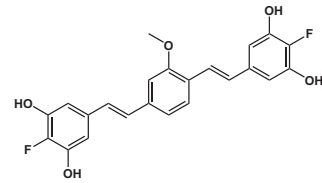
Aβ-Plaques: positiv, gute Übersicht/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr guter Kontrast, stärkere

Fluoreszenz als auf den Plaque (rechtes Bild: Ölimmersionsbild)

Bemerkungen: teilweise Gewebe stark verdaut, moderates

Fotobleaching [B: 10]

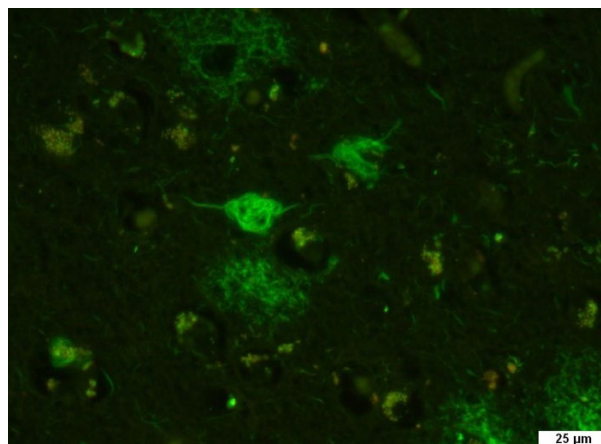
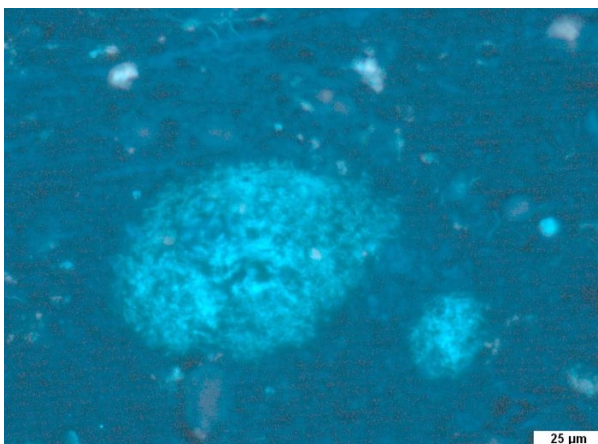


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

Bowmandrüsen: negativ, keine Befund

Bemerkungen: Färbung des elastischen Gewebes, Epithel der Drüse und die weichen Blutgefäße (Zerebrale Amyloidangiopathie, linkes Bild) [B: 7]

Histologie von BSc4218

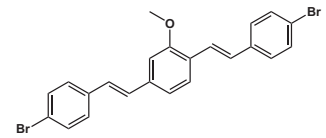


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

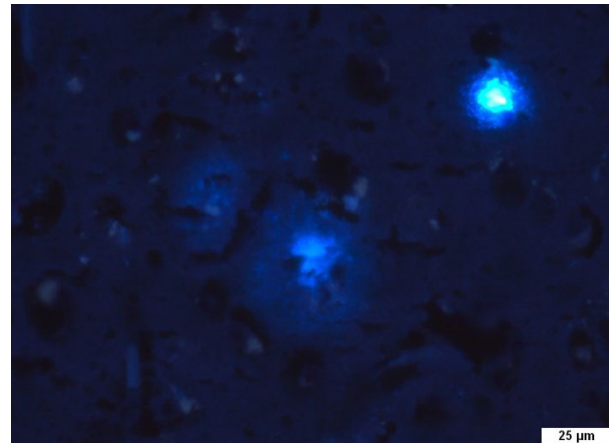
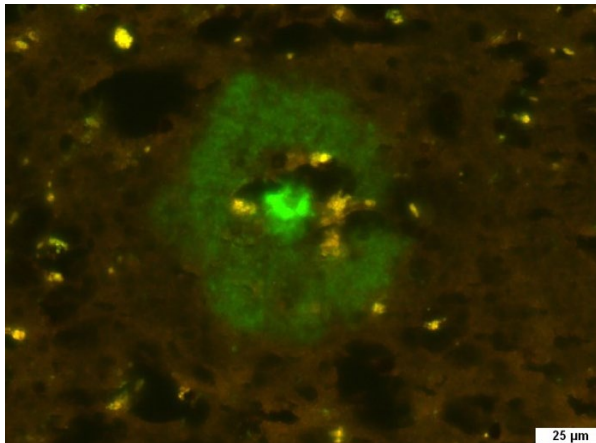
A β -Plaques: positiv, gute Übersicht/Kontrast,
(es scheint nur das enthaltene Tau gefärbt zu sein)

Tau-Fibrillen: positiv, sehr gut Feinstruktur; Farbeindruck:
eher türkis im FITC

Bemerkungen: gewisse Tau selektivität, Bilder auf Parafinfixiertem Gewebe und frischen
Hirnschnitten (München) ergaben gleich gute Färberesultate [B: 10]



Histologie von BSc4082

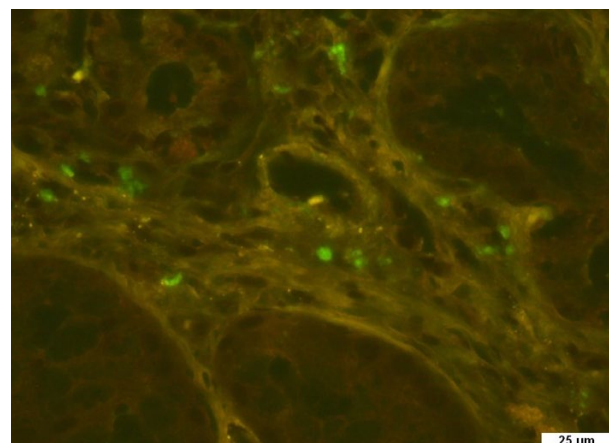
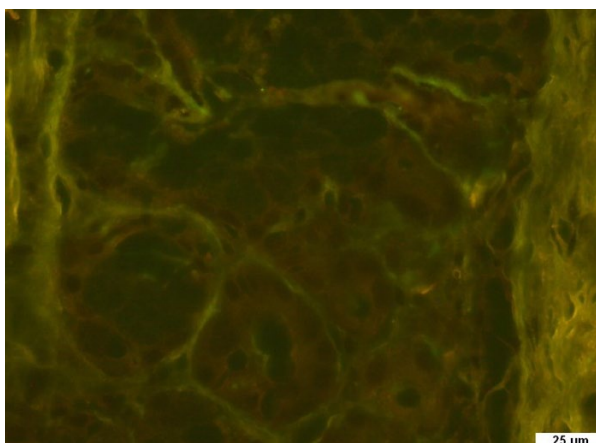
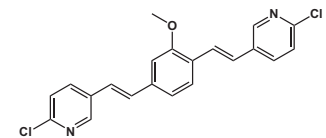


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 87

A β -Plaques: positiv, gute Übersicht/Kontrast/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: negativ

Bemerkungen: teilweise Gewebe stark verdaut;
vergleichbar mit Thioflavin [B: 9]

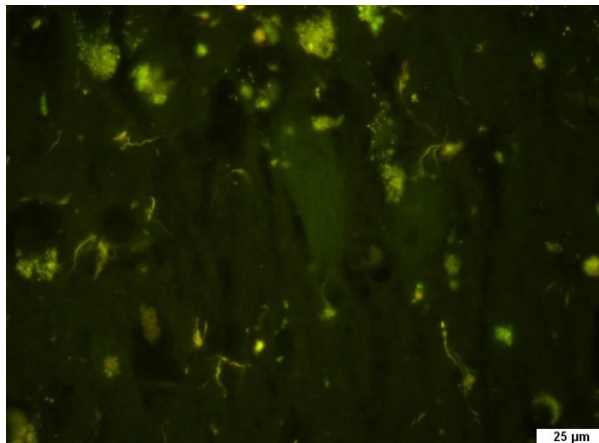
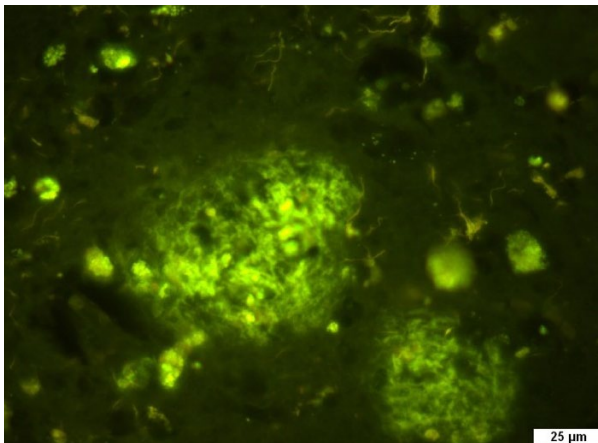


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Baumannschendrüsen: positiv, sind gut gefärbt Kontrast zum Hintergrund gut aber mäßige Fluoreszenz

Bemerkungen: Punktförmige Färbung im Nerv neben Astrozyt, unbekannte Struktur im Nervengewebe gefärbt, Löslichkeit/Galenik eventuell problematisch; viel Lipofuscin [B: 9]

Histologie von BSc4357

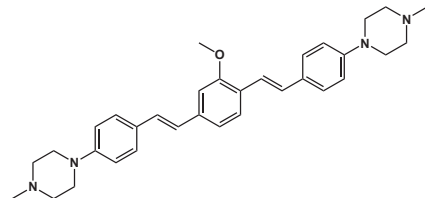


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 67

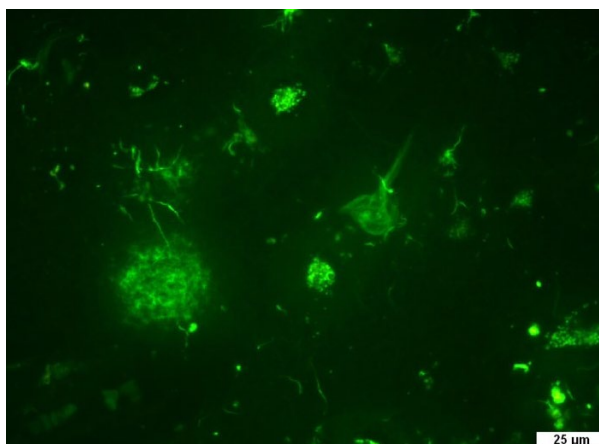
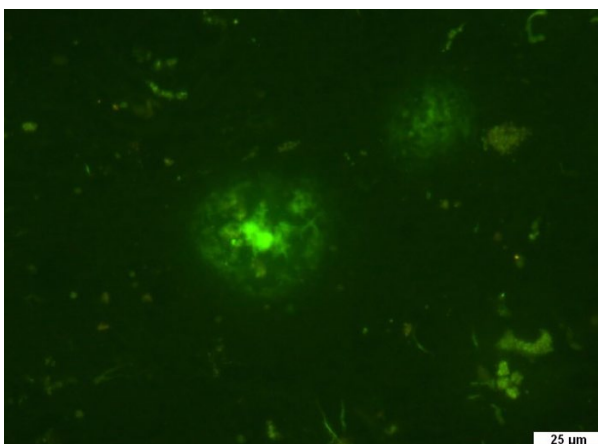
Aβ-Plaques: positiv, sehr guter Kontrast/Fluoreszenz, gute Übersicht

Tau-Fibrillen: negativ

Bemerkungen: Bleachingstabil, Färbung der Astrozytenfortsätze [B: 6]



Histologie von BSc4307

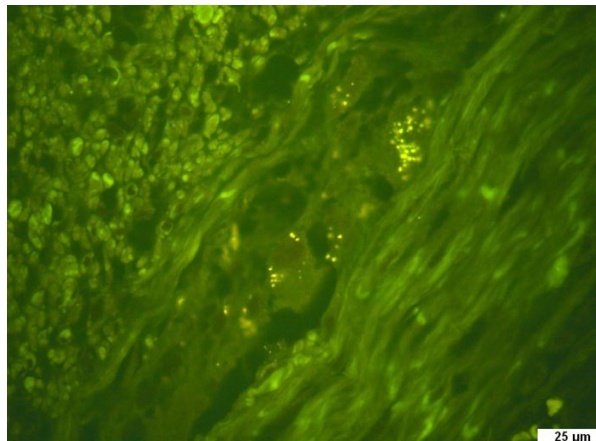
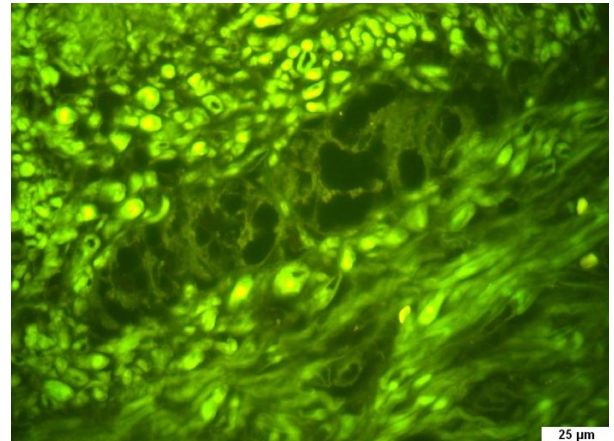
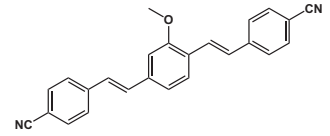


Gewebeart: AH | **Patient:** weiblich | **Alter:** 88

A β -Plaques: positiv, gute Übersicht, klassische kernhaltige Plaque
sehr guter Kontrast, Fleecy Amyloid

Tau-Fibrillen: positiv, guter Kontrast/Fluoreszenz

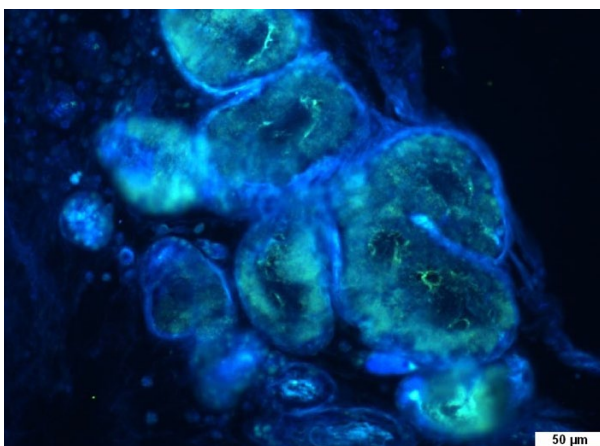
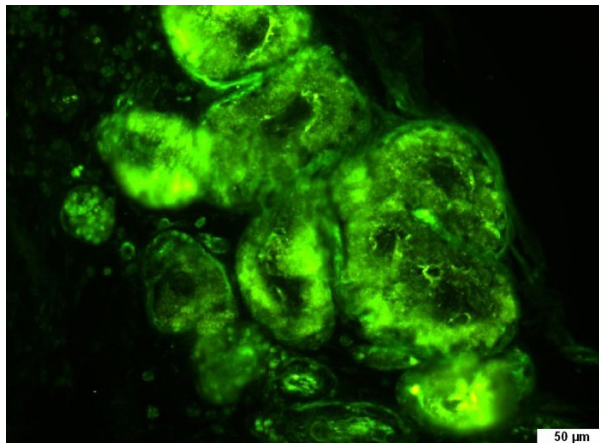
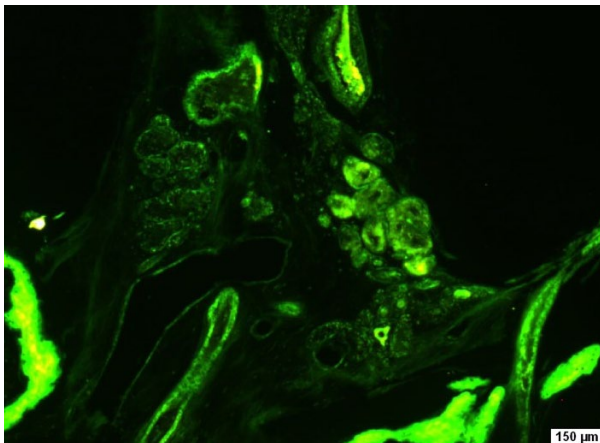
Bemerkungen: teilweise viel Material auf der Oberfläche ausgefallen [B: 8]



Gewebeart: Darmwand | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

Tau-Ablagerungen: negativ, keine Färbung

Bemerkungen: Diffuses in den Ganglien gefärbt aber nur schwach,
viel Lipofuscin zu sehen [B: 6]

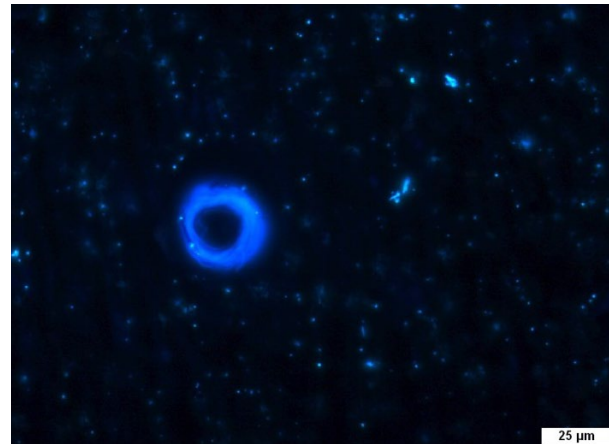
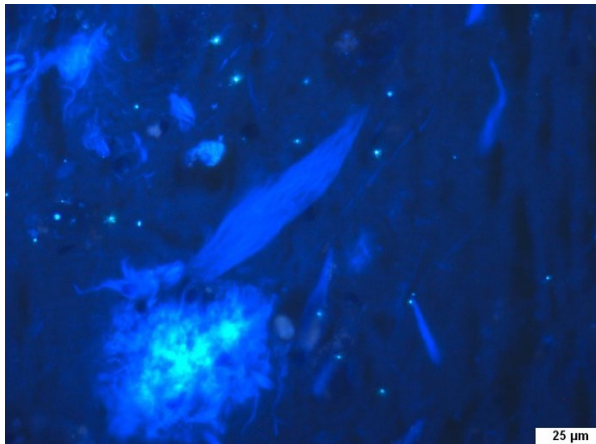


Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmandrüsen: positiv, sehr gute selektive Anfärbung/Fluoreszenz

Bemerkungen: Negativ auf anderen Drüsen, teilweise Färbung der Kerne
grüner Farbeindruck im Blaufilter [B: 8]

Histologie von BSc4308

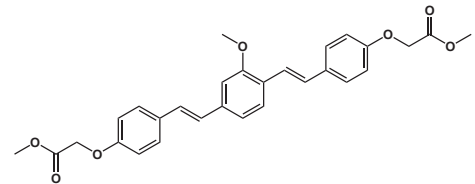


Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 82

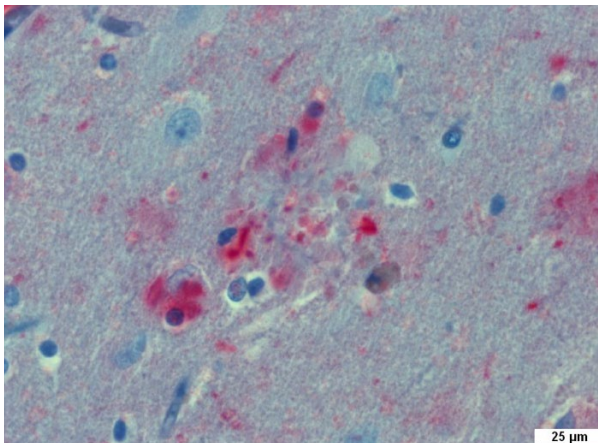
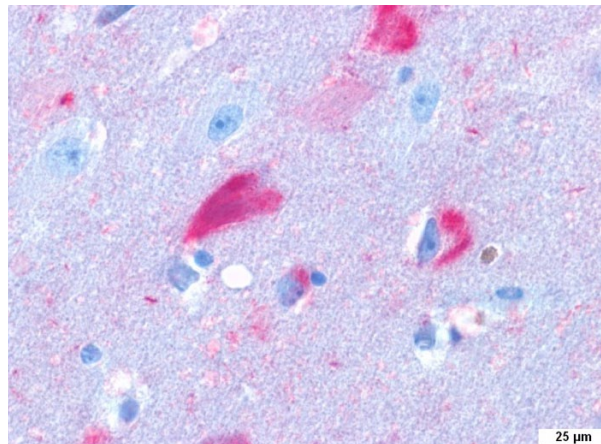
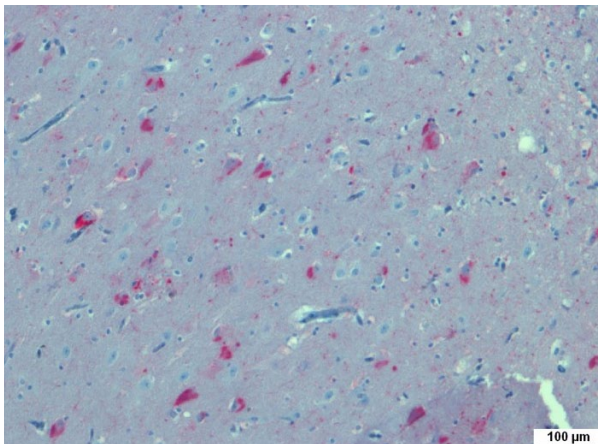
Aβ-Plaques: positiv, sehr gute Übersicht/Fluoreszenz

Tau-Fibrillen: positiv, sehr gute Übersicht/Fluoreszenz

Bemerkungen: Zerebrale Amyloidangiopathie in den Blutgefäßen sehr stark positiv auf Aβ mit hoher Intensität, viel Material auf der Oberfläche ausgefallen, Gewebeschnitt teilweise mechanisch beschädigt [B: 7]



Immunhistologische Untersuchungen der verwendeten Gewebeproben

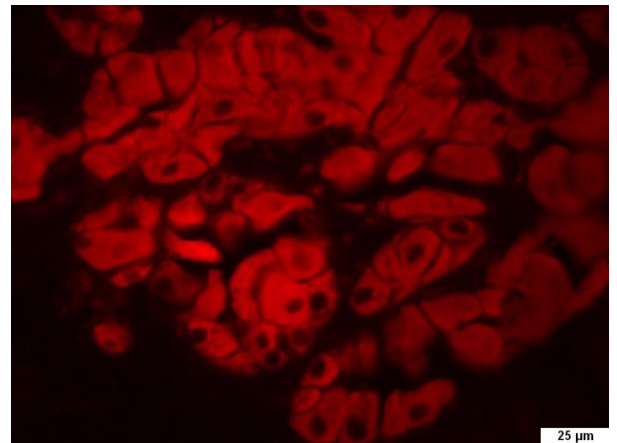
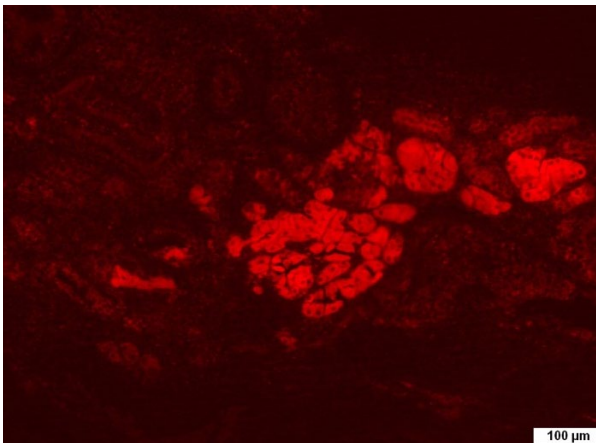
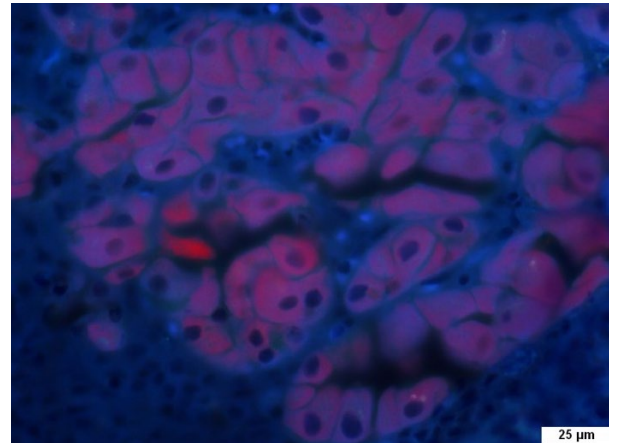
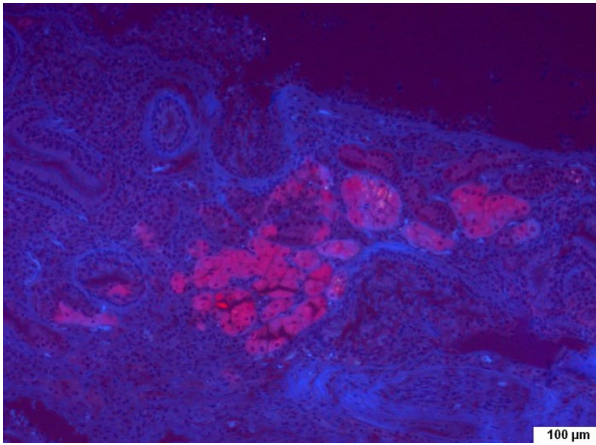
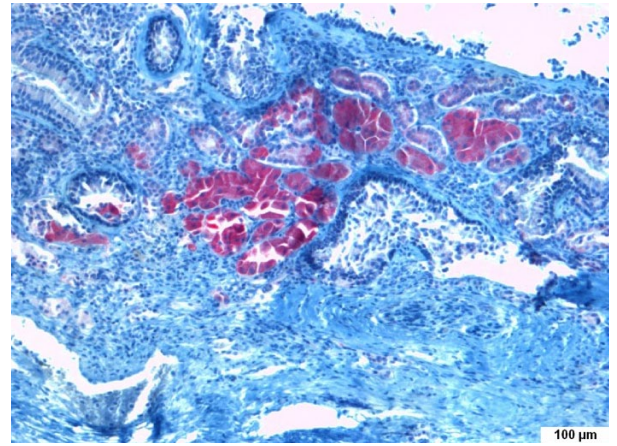
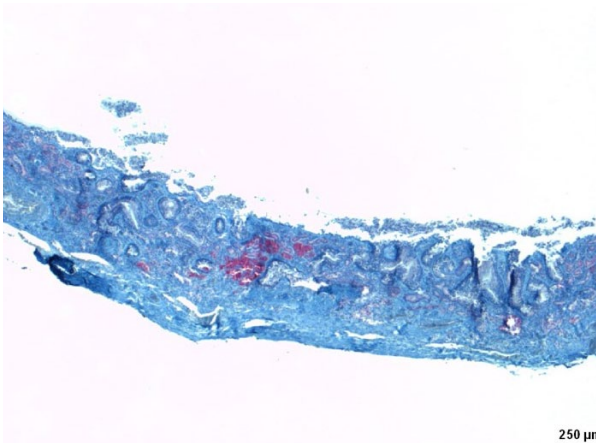


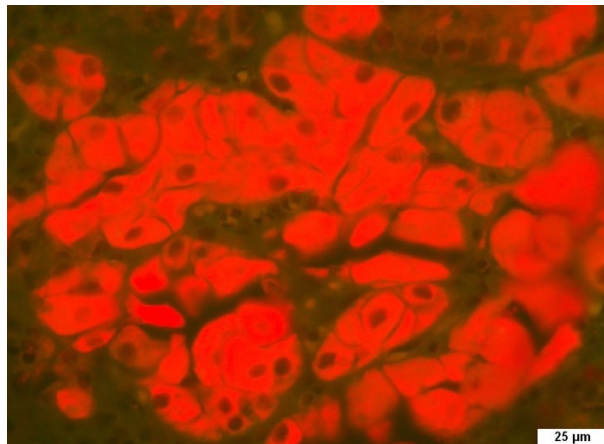
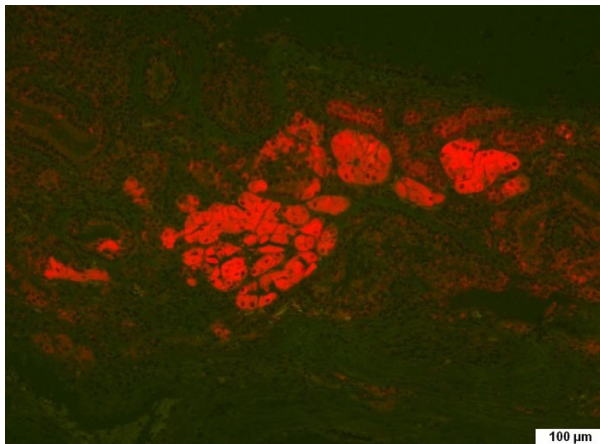
Gewebeart: AH | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Aβ-Plaques: positiv, Nachweis der TAU-Ablagerung in Plaques (Bild unten links)

Tau-Fibrillen: positiv, Nachweis fibrillärer TAU-Ablagerung in Neuronen

Bemerkungen: Tau Antikörper mit anschließender Fuchsin Färbung [B: 7]





Gewebeart: Riechschleimhaut | **Patient:** männlich | **Alter:** 89

Bowmann Drüsen: positiv, selektive Akkumulation von pathogenem Tau

Bemerkungen: Tau Antikörper mit Fuchsinrot gefärbt.

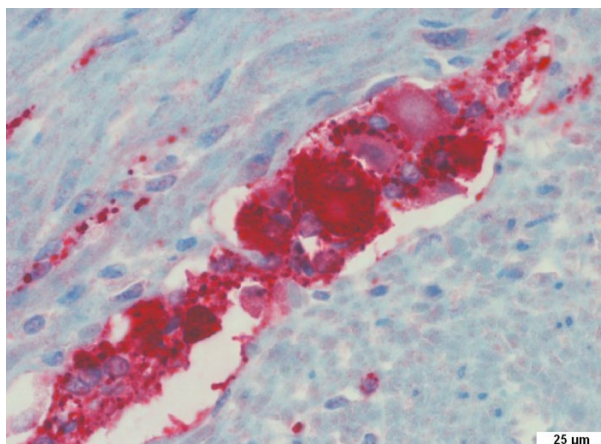
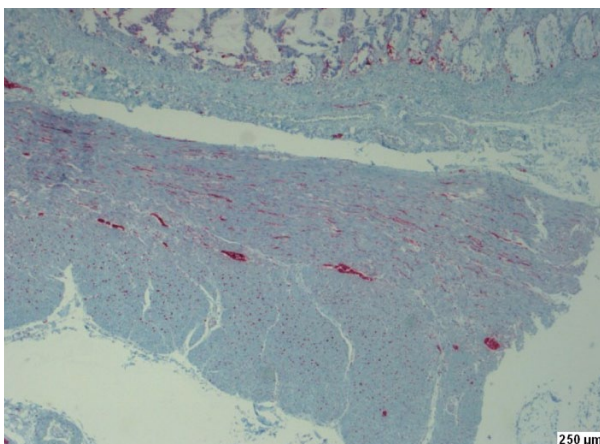
Erläuterung zu den Bildern paarweise von oben nach unten:

TAU-Immunhistologie Durchlicht

TAU-Immunhistologie Fluoreszenzmikroskop DAPI-Filter

TAU-Immunhistologie Fluoreszenzmikroskop Auramin-Filter

TAU-Immunhistologie Fluoreszenzmikroskop FITC-Filter



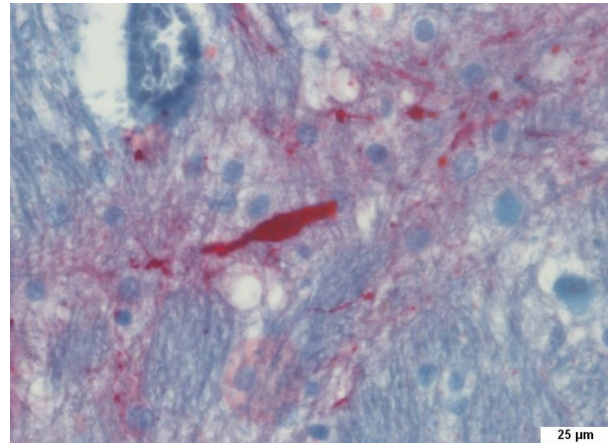
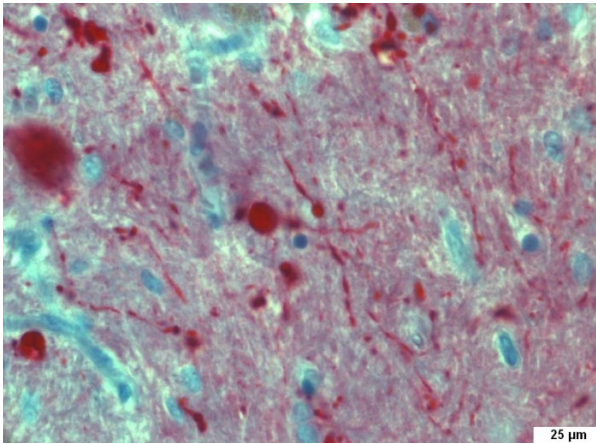
Gewebeart: Dickdarmwand | **Patient:** weiblich | **Alter:** 78

Tau-Ablagerungen: positiv

Bemerkungen: Tau Antikörper mit anschließender Fuchsin Färbung

Verteilung der Tau-Ablagerungen in den Ganglien eher unklar bis hin zu einer negativen Korrelation.

Morbus Parkinson



Gewebeart: Substantia nigra (Mittelhirn) | **Patient:** weiblich | **Alter:** 75

Bemerkungen: Typische Lewy-Body-Ablagerungen, Verdickung im Axiom

Literaturverzeichnis

- [1] C. J. Vas, World Health Organization, *Alzheimer's Disease* **2001**.
- [2] H. Braak, E. Braak, *Acta Neuropathol* **1991**, 82, 239.
- [3] a) T. Rapp, *J. Nutr. Health. Aging*. **2010**, 14, 630; b) C. Mount, C. Downton, *Nat. Med.* **2006**, 12, 780.
- [4] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 3074.
- [5] L. Bertram, R. E. Tanzi, *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 1449.
- [6] A. D. Roses, *Neurobiol. Dis.* **1997**, 4, 170.
- [7] J. A. Hardy, G. A. Higgins, *Science* **1992**, 256, 184.
- [8] A. C. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5562.
- [9] M. Francesca, S. Alina, W. Bengt, M. Patrizia, K. Miia, *The Lancet Neurology* **2010**, 9, 702.
- [10] J. W. Johnson, S. E. Kotermanski, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 61.
- [11] C. A. Hawkes, J. McLaurin, *Expert Rev. Neurother.* **2007**, 7, 1535.
- [12] G. Thinakaran, E. H. Koo, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29615.
- [13] S. Weggen, M. Rogers, J. Eriksen, *Trends. Pharmacol. Sci.* **2007**, 28, 536.
- [14] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R. A. Crowther, *Neuron* **1989**, 3, 519.
- [15] A. Schneider, E. Mandelkow, *Neurotherapeutics* **2008**, 5, 443.
- [16] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 1858.
- [17] R. Medeiros, D. Baglietto-Vargas, F. M. Laferla, *CNS Neurosci. Ther.* **2010**.
- [18] B. Trinczek, J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Mol. Biol. Cell.* **1995**, 6, 1887.
- [19] J. Berriman, L. C. Serpell, K. A. Oberg, A. L. Fink, M. Goedert, R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9034.
- [20] F. Hernandez, J. Avila, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2007**, 64, 2219.
- [21] D. R. Thal, M. Holzer, U. Rub, G. Waldmann, S. Gunzel, D. Zedlick, R. Schober, *Exp. Neurol.* **2000**, 163, 98.
- [22] L. Tarassishin, Y. I. Yin, B. Bassit, Y. M. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17050.
- [23] S. Urban, M. Freeman, *Current Opinion in Genetics & Development* **2002**, 12, 512.
- [24] N. H. S. Baumann, B. Schmidt *Medicinal Chemistry of Alzheimer's Disease*, A. Martinez, Ed.; *Research Signpost* **2008**.
- [25] M. S. Wolfe, *Biochemistry* **2006**, 45, 7931.

-
- [26] a) T. Tomita, R. Takikawa, A. Koyama, Y. Morohashi, N. Takasugi, T. C. Saido, K. Maruyama, T. Iwatsubo, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 10627; b) A. Tolia, L. Chavez-Gutierrez, B. De Strooper, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27633.
- [27] N. Isoo, C. Sato, H. Miyashita, M. Shinohara, N. Takasugi, Y. Morohashi, S. Tsuji, T. Tomita, T. Iwatsubo, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12388.
- [28] W. P. Esler, C. Das, W. A. Campbell, W. T. Kimberly, A. Y. Kornilova, T. S. Diehl, W. Ye, B. L. Ostaszewski, W. Xia, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *Nat. Cell. Biol.* **2002**, *4*, E110.
- [29] S. Zhou, H. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2553.
- [30] W. T. Kimberly, W. Xia, T. Rahmati, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3173.
- [31] A. Capell, J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D. J. Selkoe, C. Haass, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3205.
- [32] R. Kopan, M. X. Ilagan, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, *5*, 499.
- [33] B. Schmidt., S. Baumann, H. A. Braun, G. Larbig, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 377.
- [34] D. Pissarnitski, *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2007**, *10*, 392.
- [35] P. Blurton., F. Burkamp., I. Churcher, T. Harrison., J. Neduvilil, (Merck Sharp &Dohme Limited, UK) WO2006008558, **2006**, p. 58 pp.
- [36] a) F. Wilson., A. Reid, V. Reader, R. J. Harrison, M. Sunose, R. Hernandez-Perni, J. Major, C. Boussard, K. Smelt, J. Taylor, A. Leformal, A. Cansfield, S. Burckhardt, (Cellzome A.-G., Germany) WO2006045554 **2006**, p. 57 pp; b) N. Ramsden, F. Wilson, (Cellzome A.-G., Germany) WO2006048219 **2006**, p. 35 pp.
- [37] H. Kaduszkiewicz, T. Zimmermann, H. P. Beck-Bornholdt, H. van den Bussche, *BMJ* **2005**, *331*, 321.
- [38] P. L. McGeer, E. G. McGeer, *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 789.
- [39] S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, E. H. Koo, *Nature* **2001**, *414*, 212.
- [40] S. Weggen, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, C. U. Pietrzik, T. E. Golde, E. H. Koo, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30748.
- [41] F. Panza, V. Solfrizzi, V. Frisardi, C. Capurso, A. D'Introno, A. M. Colacicco, G. Vendemiale, A. Capurso, B. P. Imbimbo, *Drugs Aging* **2009**, *26*, 537.
- [42] B. Vellas, *Lancet. Neurol.* **2010**, *9*, 235.
-

-
- [43] a) R. Narlawar, B. I. Pérez Revuelta, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, K. Baumann, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 7588; b) R. Narlawar, B. I. Pérez Revuelta, K. Baumann, R. Schubel, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 176.
- [44] S. Baumann, N. Höttecke, R. Schubel, K. Baumann, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 6986.
- [45] D. R. Thal, H. Braak, *Pathologie* **2005**, 26, 201.
- [46] E. Kalbe, P. Calabrese, S. Schwalen, J. Kessler, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2003**, 16, 193.
- [47] D. T. Grimmer, P. D. A. Drzezga, D. H. Stimmer, *Alzheimer Info* **2005**, 01, 10.
- [48] a) M. T. Fodero-Tavoletti, C. C. Rowe, C. A. McLean, L. Leone, Q. X. Li, C. L. Masters, R. Cappai, V. L. Villemagne, *J. Nucl. Med.* **2009**, 50, 198. b) A. Kadir, A. Nordberg, *J. Nucl. Med.* **2010**, 51, 1418.
- [49] T. Gomez-Isla, R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi, B. T. Hyman, *Ann. Neurol.* **1997**, 41, 17.
- [50] H. Hampel, R. Frank, K. Broich, S. J. Teipel, R. G. Katz, J. Hardy, K. Herholz, A. L. Bokde, F. Jessen, Y. C. Hoessler, W. R. Sanhai, H. Zetterberg, J. Woodcock, K. Blennow, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9, 560.
- [51] T. Schaeffter, *Prog. Drug. Res.* **2005**, 62, 15.
- [52] a) S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1501; b) A. Abbott, *Nature* **2008**, 456, 161; c) B. M. Swahn, D. Wensbo, J. Sandell, D. Sohn, C. Slivo, D. Pyring, J. Malmstrom, E. Arzel, M. Vallin, M. Bergh, F. Jeppsson, A. E. Johnson, A. Jureus, J. Neelissen, S. Svensson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1976.
- [53] M.-C. Lasne, C. Perrio, J. Rouden, L. Barré, D. Roeda, F. Dolle, C. Crouzel, in *Contrast Agents II*, Vol. 222 (Ed.: W. Krause), Springer Berlin/Heidelberg **2002**, pp. 201. wolfram-alpha.com.
- [54] E. D. Agdeppa, M. E. Spilker, *AAPS J.* **2009**, 11, 286.
- [55] C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, G. F. Huang, M. L. Debnath, W. E. Klunk, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2740.
- [56] M. Ono, A. Wilson, J. Nobrega, D. Westaway, P. Verhoeff, Z. P. Zhuang, M. P. Kung, H. F. Kung, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30, 565.
-

-
- [57] C. C. Rowe, U. Ackerman, W. Browne, R. Mulligan, K. L. Pike, G. O'Keefe, H. Tochon-Danguy, G. Chan, S. U. Berlangieri, G. Jones, K. L. Dickinson-Rowe, H. P. Kung, W. Zhang, M. P. Kung, D. Skovronsky, T. Dyrks, G. Holl, S. Krause, M. Friebe, L. Lehman, S. Lindemann, L. M. Dinkelborg, C. L. Masters, V. L. Villemagne, *Lancet Neurol* **2008**, 7, 129.
- [58] Y. Kudo, N. Okamura, S. Furumoto, M. Tashiro, K. Furukawa, M. Maruyama, M. Itoh, R. Iwata, K. Yanai, H. Arai, *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 553.
- [59] E. D. Agdeppa, V. Kepe, J. Liu, S. Flores-Torres, N. Satyamurthy, A. Petric, G. M. Cole, G. W. Small, S. C. Huang, J. R. Barrio, *J. Neurosci.* **2001**, 21, RC189.
- [60] M. P. Kung, C. Hou, Z. P. Zhuang, B. Zhang, D. Skovronsky, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, H. F. Kung, *Brain Res.* **2002**, 956, 202.
- [61] D. W. Dickson, *Neurobiology of Aging* **1997**, 18, S21.
- [62] J. U. Voigt, *Methods* **2009**, 48, 92.
- [63] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 3244.
- [64] Y. Imanishi, K. H. Lodowski, Y. Koutalos, *Biochemistry* **2007**, 46, 9674.
- [65] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 7075.
- [66] K. König, *Journal of Microscopy* **2000**, 200, 83.
- [67] W. Denk, K. Svoboda, *Neuron* **1997**, 18, 351.
- [68] V. Parisi, *Semin Ophthalmol.* **2003**, 18, 50.
- [69] P. Jindahra, T. R. Hedges, C. E. Mendoza-Santiesteban, G. T. Plant, *Curr. Opin. Neurol.* **2010**, 23, 16.
- [70] a) M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V. Ljubimov, C. A. Miller, M. K. Ko, K. L. Black, M. Schwartz, D. L. Farkas, *Neuroimage* **2011**, 54, 204; b) L. Gasparini, R. Anthony Crowther, K. R. Martin, N. Berg, M. Coleman, M. Goedert, M. G. Spillantini, *Neurobiology of Aging* **2009**, In Press, Corrected Proof.
- [71] V. Wismann, *Optik & Photonik* **2010**, Nr. 1 April.
- [72] L. Riggs, University of Florida, *Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils* **2006**.
- [73] J. Chin, *Methods Mol. Biol.* **2011**, 670, 169.
- [74] W. E. Klunk, B. J. Bacskaï, C. A. Mathhis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang, B. T. Hyman, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2002**, 61, 797.
-

-
- [75] B. J. Bacskai, S. T. Kajdasz, R. H. Christie, C. Carter, D. Games, P. Seubert, D. Schenk, B. T. Hyman, *Nat. Med.* **2001**, 7, 369.
- [76] N. Höttecke, S. Baumann, A. Taghavi, H. A. Braun, Boris Schmidt, *Frontiers in Medicinal Chemistry* **2009**, Vol. 4, 730.
- [77] N. Okamura, T. Suemoto, S. Furumoto, M. Suzuki, H. Shimadzu, H. Akatsu, T. Yamamoto, H. Fujiwara, M. Nemoto, M. Maruyama, H. Arai, K. Yanai, T. Sawada, Y. Kudo, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 10857.
- [78] Z. P. Zhuang, M. P. Kung, C. Hou, K. Plossl, D. Skovronsky, T. L. Gur, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, H. F. Kung, *Nucl. Med. Biol.* **2001**, 28, 887.
- [79] M. Garcia-Alloza, L. A. Borrelli, A. Rozkalne, B. T. Hyman, B. J. Bacskai, *J. Neurochem.* **2007**, 102, 1095.
- [80] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2620.
- [81] K. Smith, *Plenum Press: New York*, **1977**.
- [82] P. P. Ghoroghchian, M. J. Therien, D. A. Hammer, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, 1, 156.
- [83] R. Y. Tsien, *Annu Rev Biochem* **1998**, 67, 509.
- [84] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Letters* **2003**, 4, 11.
- [85] N. J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson, *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, 7, 41.
- [86] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, 3.
- [87] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry Vol. 4*, Oxford University Press **2009**.
- [88] J. Giacomotto, L. Segalat, *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160, 204.
- [89] J. Schredelseker, G. Krumschnabel, *Biologie in unserer Zeit* **2009**, 39, 389.
- [90] D. Paquet, R. Bhat, A. Sydow, E. M. Mandelkow, S. Berg, S. Hellberg, J. Falting, M. Distel, R. W. Koster, B. Schmid, C. Haass, *J. Clin. Invest.* **2009**, 119, 1382.
- [91] L. I. Zon, R. T. Peterson, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, 4, 35.
- [92] J. Y. Wu, C. Y. Lin, T. W. Lin, C. F. Ken, Y. D. Wen, *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 1336.
- [93] J. Y. Jeong, H. B. Kwon, J. C. Ahn, D. Kang, S. H. Kwon, J. A. Park, K. W. Kim, *Brain. Res. Bull.* **2008**, 75, 619.
- [94] R. J. Herr, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3379.
- [95] G. I. Koldobskii, V. A. Ostrovskii, *Russian Chemical Reviews* **1994**, 63, 797.
- [96] Z. P. Demko, K. B. Sharpless, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 7945.
-

-
- [97] D. Amantini, R. Beleggia, F. Fringuelli, F. Pizzo, L. Vaccaro, *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 2896.
- [98] P. Wasserscheid, T. Welton, *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [99] H. F. Kung, S. R. Choi, W. Qu, W. Zhang, D. Skovronsky, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 933.
- [100] a) L. Pascal, J. J. Vanden Eynde, Y. Van Haverbeke, P. Dubois, A. Michel, U. Rant, E. Zojer, G. Leising, L. O. Van Dorn, N. E. Gruhn, J. Cornil, J. L. Brédas, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 6442; b) S. Achelle, I. Nouria, B. Pfaffinger, Y. Ramondenc, N. Ple, J. Rodriguez-Lopez, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3711.
- [101] R. Narlawar, M. Pickhardt, S. Leuchtenberger, K. Baumann, S. Krause, T. Dyrks, S. Weggen, E. Mandelkow, B. Schmidt, *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 165.
- [102] J. J. V. Eynde, L. Pascal, Y. Van Haverbeke, P. Dubois, *Synthetic Communications* **2001**, 31, 3167
- [103] M. Mulisch, U. H. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*, Spektrum Akademischer Verlag **2010**, Vol. 18.
- [104] M. Titford, *Biotech. Histochem.* **2005**, 80, 73.
- [105] H. Watanabe, M. Ono, R. Ikeoka, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6402.
- [106] J. Appleton, *Natural Medicine Journal* **2010**, (2)1, 1.
- [107] M. S. Gohel, A. H. Davies, *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2009**, 7, 303.
- [108] K. D. Volkova, V. B. Kovalska, A. O. Balanda, M. Y. Losytskyy, A. G. Golub, R. J. Vermeij, V. Subramaniam, O. I. Tolmachev, S. M. Yarmoluk, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 1452.
- [109] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer **2006**, Vol. 4.
- [110] Y. S. Eisele, U. Obermuller, G. Heilbronner, F. Baumann, S. A. Kaeser, H. Wolburg, L. C. Walker, M. Staufenbiel, M. Heikenwalder, M. Jucker, *Science* **2010**, 330, 980.
- [111] a) S. Thirunavukkuarasu, E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.* **2008**, 378, 1064; b) J. F. Morley, H. I. Hurtig, *Neurology* **2010**, 75, 9; c) F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333.
- [112] M. A. Burack, J. Hartlein, H. P. Flores, L. Taylor-Reinwald, J. S. Perlmutter, N. J. Cairns, *Neurology* **2010**, 74, 77.
-

-
- [113] a) S. E. Arnold, G. S. Smutzer, J. Q. Trojanowski, P. J. Moberg, *Ann. NY Acad. Sci.* **1998**, 855, 762; b) M. M. Esiri, G. K. Wilcock, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **1984**, 47, 56; c) T. G. Ohm, H. Braak, *Acta Neuropathol.* **1987**, 73, 365; d) R. G. Struble, H. B. Clark, *Neurobiol. Aging* **1992**, 13, 469; e) J. Q. Trojanowski, P. D. Newman, W. D. Hill, V. M. Lee, *J. Comp. Neurol.* **1991**, 310, 365.
- [114] R. F. Itzhaki, M. A. Wozniak, D. M. Appelt, B. J. Balin, *Neurobiol. Aging.* **2004**, 25, 619.
- [115] C. L. Joachim, H. Mori, D. J. Selkoe, *Nature* **1989**, 341, 226.
- [116] A. Cabal, V. Alonso-Cortina, L. O. Gonzalez-Vazquez, F. J. Naves, M. E. Del Valle, J. A. Vega, *Brain Research Bulletin* **1995**, 38, 417.
- [117] A. Eickhoff, J. F. Riemann, *Internist (Berl)* **2003**, 44, 873.
- [118] J. M. Spitsbergen, M. L. Kent, *Toxicol. Pathol.* **2003**, 31, 62.
- [119] C. Nüsslein-Volhard, R. Dahm, *Zebrafish: A Practical Approach*, Oxford University Press **2001**, Vol. 1.
- [120] P. D. W. Scharmann, Brämsche, (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.) **2004**, Vol. 4.
- [121] M. Grüger, HEAG, Darmstadt, <http://www.hse.ag/geschaeftsfelder/erzeugung/trinkwasser/wasserwerte-amp-analysedaten.html> **2011**.
- [122] F. Soares, M. Dinis, F. Lahnsteiner, L. Ribeiro, *Methods in Reproductive Aquaculture* (CRC Press) **2008**, pp. 149.
- [123] R. Nagel, *ALTEX* **2002**, 19 (Suppl 1), 38.
- [124] a) M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 6903; b) S. Beaupre, P. L. Boudreault, M. Leclerc, *Adv. Mater.* **2010**, 22, E6; c) C. F. Zhao, R. Gvishi, U. Narang, G. Ruland, P. N. Prasad, *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, 4526; d) J. G. Veinot, T. J. Marks, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 632.

Anhang

Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Succidia AG, labor&more.





Prof. Boris Schmidt, geb. 1962 in San Fernando/Tinidad & Tobago, studierte am Imperial College London und an der Universität Hannover Chemie, wo er 1991 in Organischer Chemie bei Prof. H.M.R. Hoffmann promovierte. Von 1991-94 lehrte er am Biomedical Centre in Uppsala, Schweden, dann folgte ein PostDoc-Aufenthalt bei Prof. K. B. Sharpless am Scripps Research Institute, La Jolla Kalifornien. Es schloss sich von 1994-1999 die Habilitation in Organischer Chemie an der Universität Hannover an. 1999-2002 arbeitete er bei der Novartis Pharma AG in Basel in der Forschungsgruppe CNS (Central Nervous System). Seit 2002 hat er eine C3-Professur am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt inne.

Die verlässliche Diagnose von Alzheimer-Demenz als Schlüsselschritt zur Bekämpfung der Krankheit

Daniel Kieser,
Prof. Dr. Boris Schmidt und
Dr. Roland Heyny-von Haussen
Institut für Organische Chemie
und Biochemie,
Technische Universität Darmstadt

Morbus Alzheimer ist eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die etwa 15% der über 65-Jährigen betrifft. Unter Einbezug des demografischen Wandels wird sich die Zahl von Erkrankten bis 2020 auf global 42 Millionen Menschen erhöht haben.

Alzheimer-Demenz (AD) ist damit die am weitesten verbreitete neurodegenerative Krankheit mit erheblichen sozioökonomischen Auswirkungen auf die Gesellschaft. Bis heute ist keine kurative Therapie bekannt. Dies liegt zum einen daran, dass die Krankheitsursache trotz intensiver Forschung noch nicht endgültig geklärt ist, andererseits mangelt es an ausreichend validen Diagnosemethoden. Diese wiederum sind unabdingbar, um einige der viel versprechenden Wirkstoffkandidaten in der klinischen Entwicklung auf ihre Wirksamkeit bezüglich einer Krankheitsverzögerung oder gar Heilung zu prüfen.

alzheimer

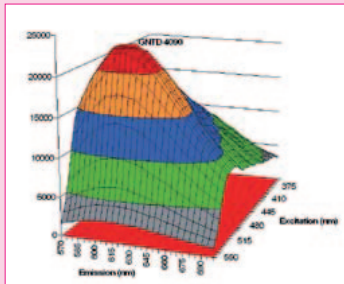


Abb. 1 2-D-Fluoreszenzspektrum von GNTD 4090 in Methanol aufgenommen mit Tecan Infinite M 1000

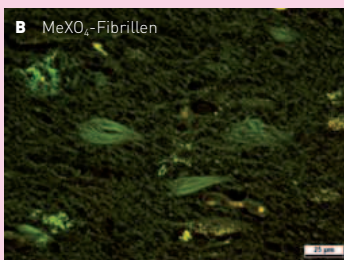


Abb. 2 Histologieschnitte gefärbt mit MeXO₄, GNTD 4090, klassische Tau- und Aβ-Ablagerungen im Ammonshorn eines 89 Jahre alten AD-Patienten, DAPI- und FITC-Filter (Mikroskop: Zeiss Akioskop; ABO 100 Hg-Fluoreszenzlampe; Kamera: Leica DFC 300FX)

Der Arbeitskreis von Prof. Schmidt ist so genannten Imaging-Farbstoffen auf der Spur, die es ermöglichen, die für die Erkrankung charakteristischen krankhaften Ablagerungen der Eiweiße Amyloid-β (Aβ) und Tau im Gehirn zu markieren und zu detektieren.

Im Jahr 1906 untersuchte der Psychiater Alois Alzheimer das Gehirn seiner Patientin Auguste Deter, die im Alter von 56 Jahren verstarb.

Alzheimer selbst beschrieb zu Lebzeiten die Patientin und deren Krankheitsbild mit einem Zustand völliger Ratlosigkeit. Sie sei äußerlich deutlich vorgealtert, zeitlich und örtlich gänzlich desorientiert, von ängstlicher Unruhe gepackt, aggressiv und enthemmt oder zeitweilig völlig delirant gewesen.

Die Sektion hatte ergeben, dass große Teile der Hirnrinde zurückgebildet waren. In den feingeweblichen mikroskopischen Untersuchungen des Gehirngewebes von Auguste Deter fand er charakteristische Abweichungen in der normalen Struktur des Nervengewebes bestimmter Hirnareale, die er als knäuelartige Schlingen (Neurofibrillen) in Nervenzellen und extrazelluläre Eiweißablagerungen (plaqueartige Amyloidablagerungen) beschrieb.

Auch mehr als 100 Jahre später sind Neurofibrillen und Amyloidablagerungen noch immer die Kennzeichen der Krankheit. Die intrazellulären neurofibrillären Bündel bestehen aus paarigen helikalen Filamenten eines abnorm phosphorylierten und gefalteten Proteins namens Tau. Die extrazellulären Plaques bestehen überwiegend aus Aβ-Peptidfragmenten.

Die intrazytoplasmatischen Tau-Ablagerungen beeinträchtigen die Funktion der betroffenen Nervenzellen und führen zwangsläufig zu deren vorzeitigem Absterben. Den extrazellulären Aβ-Ablagerungen geht eine intraneuronale Akkumulation von Aβ voraus. Zum Zeitpunkt der ersten klinischen Symptome sind jedoch bereits ausgedehnte extrazelluläre Aβ-Ablagerungen nachweisbar.

Man klassifiziert die Patienten in zwei Gruppen: Patienten mit frühem (early onset AD; EOAD) und spätem (late onset AD; LOAD) Krankheitsausbruch.

Die EOAD ist eine seltene, genetisch bedingte Form der Alzheimererkrankung, hat aber viel zur Erforschung der krankheitsauslösenden Ursachen beigetragen. EOAD ist durch Mutationen in den Amyloid-Vorläuferprotein-Genen bzw. Presenilin-1- und -2-Genen begründet und tritt meist vor dem 65. Lebensjahr auf. [1]

Möglichkeiten der Diagnose

Die sichere Diagnose des Morbus Alzheimer, insbesondere die der frühen Krankheitsstadien, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch die postmortale mikroskopische Untersuchung sicher möglich.

Die Diagnose am lebenden Patienten, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung (mild cognitive impairment: MCI), ist oft nicht klar von anderen Demenzen abzugrenzen. Wenn erste Symptome im Kurzzeitgedächtnis auftreten, sind bereits erhebliche pathologische Veränderungen im Gehirn erfolgt. Zum Teil können diese Veränderungen mit so genannten nicht invasiven Untersuchungsmethoden – Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT), Positronenemissionstomografie (PET) – erkannt werden.

Die CT ist in der Lage, verschiedene Krankheitsstadien durch eine deutliche Volumenabnahme des Gehirns im Vergleich zum normalen Alterungsprozess nachzuweisen.

Mit der MRT kann die Volumenabnahme der grauen Substanz noch genauer quantifiziert und mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten korreliert werden. Die Diagnose von frühen Stadien der Krankheit ist allerdings mit diesen Methoden noch nicht möglich.

Ein Verfahren, dem man das höchste Potenzial der Frühdiagnose und auch zur Überwachung eines eventuellen Heilungsverlaufs zuspricht, ist die PET, die gezielt Aβ-Ablagerungen mithilfe radioaktiv markierter Ligandenmoleküle detektiert. [2]

Als invasive Untersuchungsmethode ist die Entnahme von Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) zu nennen, um erhöhte Aβ-Level nachzuweisen. Zur Liquoruntersuchung ist jedoch eine Rückenmarkspunktion notwendig, die mit einer nicht zu vernachlässigenden Komplikationsrate verbunden ist und somit als Vorsorgeuntersuchung nicht geeignet scheint.

Ein neuer Farbstoff

Die Synthese und Entwicklung von Aβ- und Tau-affinen Imaging-Substanzen betreibt die Arbeitsgruppe von Prof. Schmidt seit 2005. Doch mit der pathologischen Abteilung des Klinikums Darmstadt erschloss sich die Möglichkeit, die Affinitäten und Selektivitäten der jeweiligen Substanzen direkt auf Präparaten paraffineingebetteter

menschlicher Gewebeproben von Patienten mit Morbus Alzheimer zu testen. Die gängige Testung in Zellassays oder an Mäusen mit genetisch erzeugten Pathologien ist in der pharmazeutischen Forschung zwar ein unerlässliches Werkzeug geworden, aber das System Mensch ist meist doch komplexer. Die Optimierung von oben bereits erwähnten PET-Liganden sowie das Finden neuer Leitstrukturen standen hier von Anfang an im Vordergrund.

Eine klassische histologische Gewebeuntersuchung wird meist wie folgt durchgeführt:

Nach Entnahme des Gewebes am verstorbenen Patienten wird die Probe entwässert, in Paraffin eingeschlossen und dann in 10 µm dünne Scheiben geschnitten. Diese hauchdünnen Gewebestücke werden auf einen Objektträger aufgebracht und in mehreren Schritten entparaffiniert, mit Färberreagenzien behandelt und fixiert. Die Dichte der Fibrillen und Plaques wird anhand eines alterskorrelierten semiquantitativen Dichteschlüssels an immunhistologisch gefärbten oder durch moderne Silberimprägnierungsverfahren gefärbten Schnitten bestimmt. Die klassische Färbemethode bedient sich des Thioflavins, ein pflanzlicher Fluoreszenzfarbstoff, der neben Aβ-Amyloid auch Tau anfärbt.

Die Entwicklung unserer Farbstoffe erlebte durch dieses Assayverfahren eine neue Qualität.

Wir konnten neben der nötigen Selektivität und Affinität in einem nächsten Schritt die Intensität der Fluoreszenz modulieren.

Damit kommen wir zurück zum Einsatz in der Diagnostik. Es gibt bereits Versuche mit gefensterten Mäusen (ein Teil der Schädeldecke wird durch eine lichtdurchlässige Scheibe ersetzt), die Ablagerungen in ihrer Entstehung zu beobachten. Diese Methode ist für eine mögliche Diagnose am Menschen natürlich nicht empfehlenswert. Wer möchte sich schon ein Loch in den Kopf bohren lassen. Aber denkbar wäre es, nach Verabreichung einer kleinen Menge Farbstoff, der entsprechende Pathologien anfärbt, mit nicht invasiven Methoden aus der spektroskopischen Antwort eine Diagnose abzuleiten. Erste Versuche an entsprechenden Gewebeproben haben sich als viel versprechend herausgestellt, aus patentrechtlichen Gründen kann an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden. Es hat damit der Wettbewerb mit dem Projektitel Germanys Next Top Dye (GNTD) begonnen. Der derzeitige Topfavorit GNTD 4090 zeigt bereits in vielen Parametern die benötigten Eigenschaften. Neben einer ausreichenden Fluoreszenz, Affinität und Selektivität auf dem Target muss die Substanz außerdem über einen ausreichenden Stokes-Shift verfügen, um nicht mit der Eigenfluoreszenz bestimmter körpereigener Fluorophore zu überlagern. Damit wäre ein Farbstoff gefunden, der zu einem nicht invasiven Diagnoseverfahren entwickelt werden könnte. Diese Methode hat im Vergleich zu den oben erwähnten Verfahren den Vorteil, dass der apparative Aufwand und damit auch die Kosten erheblich gesenkt werden könnten. Für die Synthese der Liganden wäre kein Synchrotron, der bei PET-Proben zur Isotopengewinnung eingesetzt wird, nötig. Damit wird auch das Problem der Messzeit, die in Abhängigkeit von der Halbwertszeit enge Grenzen setzt, umgangen.

Fazit

Mit neuen Fluoreszenzfarbstoffen und deren Einsatz in der In-vitro- und In-vivo-Diagnose von AD stehen neue Wege zur Erforschung und Bekämpfung dieser Krankheit offen.

1.10 labor&more



The Magic Call

Alles rund um die Nobelpreise

Die Nobelpreis-Komitees honorieren seit 1901 Meilensteine der Naturwissenschaft wie die Entdeckung der Röntgenstrahlung, des Penicillins, des Polio-Impfstoffs oder das Genetic Engineering. Die Website der Nobelpreis-Organisation ist eine unterhaltsame Ressource mit viel Hintergrundinformation zu dem prestigeträchtigsten aller Preise.

Nobelprize.org

Besonders interessieren uns hier natürlich die naturwissenschaftlichen Disziplinen. (Nach Alfred Nobels letztem Willen bestimmt die königliche schwedische Akademie der Wissenschaften Preisträger für Physik und Chemie, das Karolinska-Institut die Preise für Physiologie oder Medizin.). Die Preisträger werden auf der Website nach dem Jahr der Verleihung oder nach ihrer Disziplin geführt. Die Personen und ihre Errungenschaften sind mit Videos, Interviews oder kurzen Aufsätzen dokumentiert. Das können Stummfilme aus den frühen Jahren sein oder auch der kompletter Vortrag eines Nobelpreisträgers.

Ausgewählte Themen sind populärwissenschaftlich aufbereitet; von Laser bis Papillomavirus, von spezieller Relativität bis reversible Protein Phosphorylierung werden wissenschaftliche Ergebnisse und Modelle aus den vergangenen hundert Jahren knapp erklärt.

Lernspiele auf der Website sollen die prämierte Wissenschaft dem ganz jungen wissenschaftlichen Nachwuchs (oder sehr verspielten senior scientists) nahe bringen: Unter 'Educational Games' gibt's teils kurzweilige, teils langatmige Computerspiele etwa zu Blutgruppen, Pavlovs Hund oder dem genetischen Code (alles in englischer Sprache).

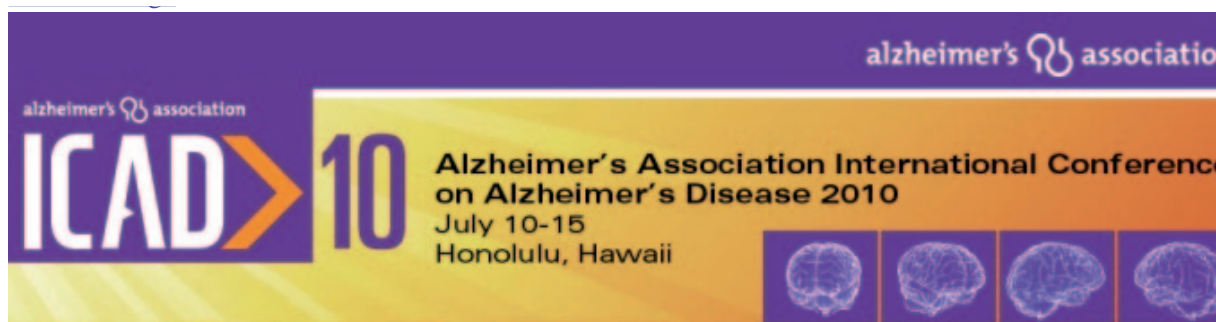
Uns einfache Sterbliche interessiert natürlich auch das Drumherum des Nobelpreises. Auch solchen Bedürfnissen wird auf nobelprize.org untern 'Award Ceremonies' Genüge getan. So erfahren wir z.B. auch Details zum opulenten Festbankett, das sich der Verleihungszeremonie anschließt.

Der Nobelpreis-Internetauftritt zeigt viele der Preisträger sympathisch skandinavisch von der menschlichen Seite. Da die Preisträger von ihrer Nominierung nur wenige Minuten vor der öffentlichen Bekanntmachung erfahren, trifft es manchen Glücklichen tief in der Nacht oder an ungewöhnlichen Orten. Günther Grass erfuhr von seinem Literatur-Nobelpreis als er beim Zahnarzt dran war. Weitere Berichte zu diesen besonderen Augenblicken erfährt man in der Rubrik 'The Magic Call'.

→ MM

Kommentare und Anregungen bitte an:





Presentation Abstract

Session: Hot Topics 3: Therapeutics/Intervention

Wednesday, Jul 14, 2010, 1:00 PM - 3:00 PM

Presentation: O4-08-07 - **Amyloid- β Plaques Pop Up Or Rather Grow?**

Pres. Time: Wednesday, Jul 14, 2010, 2:30 PM - 2:45 PM

Location: 314

Author(s): **Jochen Herms, MD¹**, Steffen Burgold, PhD¹, Tobias Bittner, PhD¹, Martin Fuhrmann, PhD¹, Daniel Kieser, PhD², Boris Schmidt, PhD².

¹University Munich, 81377 Munich, Germany, ²Technical University, 64287 Darmstadt, Germany.

Abstract: **Background:** The kinetics and mechanisms of amyloid- β plaque formation, which is one of the characteristic hallmarks in Alzheimer's disease (AD), are a fundamental issue in AD research. A previous *in vivo* two-photon imaging study in transgenic AD mouse models, published 2008 in Nature, has led to the unexpected conclusion that amyloid- β plaques do not grow after they have appeared rapidly within 24 hours.

Methods: We tried to reproduce these results in 12 month old Tg2576 mice and followed the growth kinetics of new born plaques and already existing plaques over up to 6 weeks. Additionally, we examined already existing plaques at 18 months of age, when amyloid plaque burden is in advanced stages. To label amyloid- β plaques *in vivo* the fluorescent dye methoxy-X04 was injected intraperitoneally one day before imaging.

Results: New born plaques were initially very small in size. Weekly imaging up to 6 weeks after their first appearance, however, revealed a fast and highly significant growth. Also pre-existing plaques clearly grew over 6 weeks, but with a slower kinetic. Only in 18 month old Tg2576 mice, we did not observe any new born plaques while pre-existing plaques did not grow anymore.

Conclusions: Amyloid- β plaques do grow! The most likely explanation of the fundamental discrepancies on new born plaque growth between the previous *in vivo* imaging study and ours will be presented.

Disclosures: **J. Herms**, None.

Quelle: www.alz.org/ICAD.

Daniel Kieser
Händelstraße 39
64291 Darmstadt

19.03.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

[Daniel Kieser]

Daniel Kieser
Händelstraße 39
64291 Darmstadt

19.03.2011

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

[Daniel Kieser]

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Kieser, Dipl.-Ing.
Geburtsdatum/-ort: 06. Dezember 1979, Darmstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Februar 2006 – Februar 2011

Dissertation bei Prof. Boris Schmidt

„Methodenentwicklung und Synthese von fluoreszierenden Liganden für die Diagnostik von Morbus Alzheimer“

Juli 2005 – Dezember 2005

Diplomarbeit bei Prof. Boris Schmidt, Technische Universität Darmstadt

„Synthesen in ionischen Flüssigkeiten“

Oktober 2000 – Juni 2005

Diplomstudium Chemie, Technische Universität Darmstadt

August 1999 – Juli 2000

Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Darmstadt, Rettungsdienst und Krankentransport

Juli 1999

Abitur an der Eleonorenschule, Gymnasium, Darmstadt

Veröffentlichungen

Siehe Verzeichnis in der Einleitung

Darmstadt 19.03.2011



